



①9 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑫ Übersetzung der  
europäischen Patentschrift

⑧7 EP 0 424 819 B1

⑩ DE 690 15 566 T 2

⑤1 Int. Cl.<sup>6</sup>:  
C 07 H 21/00  
C 12 Q 1/68  
C 07 C 15/16

(5)

DE 690 15 566 T 2

- |    |   |              |
|----|---|--------------|
| ②1 | Deutsches Aktenzeichen:                               | 690 15 566.2 |
| ⑧6 | Europäisches Aktenzeichen:                            | 90 120 093.1 |
| ⑧6 | Europäischer Anmeldetag:                              | 19. 10. 90   |
| ⑧7 | Erstveröffentlichung durch das EPA:                   | 2. 5. 91     |
| ⑧7 | Veröffentlichungstag<br>der Patenterteilung beim EPA: | 28. 12. 94   |
| ④7 | Veröffentlichungstag im Patentblatt:                  | 10. 8. 95    |

③0 Unionspriorität: ③2 ③3 ③1  
23.10.89 US 425740

⑦3 Patentinhaber:  
Millipore Corp., Bedford, Mass., US

⑦4 Vertreter:  
Feiler und Kollegen, 81675 München

⑧4 Benannte Vertragsstaaten:  
DE, FR, GB

⑦2 Erfinder:  
Coull, James M., Acton, Massachusetts 01720, US;  
Gildea, Brian, Canton, Massachusetts 02021, US;  
Koester, Hubert, Concord, Massachusetts 01742, US

⑤4 Umkehrbare Modifikation von biologischen Verbindungen zur Ermittlung, Trennung und Reinigung davon.

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patentamt inhaltlich nicht geprüft.

DE 690 15 566 T 2

90 120 093.1

MILLIPORE CORPORATION

5 Hintergrund der Erfindung

Im Verlauf der chemischen Synthese multifunktionaler Verbindungen ist es häufig erforderlich, Schutzgruppen einzusetzen, so daß selektive chemische Umwandlungen durchgeführt werden können. Idealerweise sollte eine Schutzgruppe einen einfachen und wirkungsvollen Schutz und eine nachfolgende Wiederherstellung einer funktionellen Gruppe an einer entschützten Verbindung gewährleisten. Schutzgruppen, die die funktionelle Gruppe irreversibel verändern können, sollten vermieden werden. Darüber hinaus sollten die Produkte auch von Nebenprodukten, die während der Synthese und während der Abspaltung der Schutzgruppe gebildet werden, ohne Schwierigkeiten gereinigt werden können.

Triphenylchlormethan (auch bekannt als Triphenylmethylchlorid und Tritylchlorid) und verwandte Derivate werden seit langem zum Schutz von Hydroxylgruppen, Aminogruppen und Thiolgruppen verwendet (vgl. T.W. Greene, "Protecting Groups in Organic Synthesis", John Wiley and Sons, NY (1981)). Das Triphenylmethylkation ist ein sterisch gehindertes Elektrophil. Diese Eigenschaft bedingt, daß sich die Tritylhalogenidspezies vorzugsweise mit weniger gehinderten Nucleophilen umsetzen läßt. Bei der Oligonucleotidsynthese werden im allgemeinen zum regioselektiven Schutz der 5'-Hydroxylgruppe des Ribonucleosids und der 2'-Desoxyribonucleosidmonomere 4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl- (4,4'-dimethoxytrityl)gruppen und die damit verwandten 9-Phenylxanthen-9-yl-gruppen (bekannter unter dem Namen Pixylgruppen) verwendet.

Eigenschaften, wie eine bevorzugte Säurelabilität, ein hydrophober Charakter und eine 5'-Regioselektivität, bedingen,

daß diese beiden Triphenylmethylderivate die Schutzgruppen der Wahl bei der Oligonucleotidsynthese sind.

Zur Erhöhung der Säurelabilität der Triphenylmethylschutzgruppe bedient man sich im allgemeinen einer Alkoxysubstitution an den Phenylringen. Detaillierte Untersuchungen von Tritylderivaten und den Einflüssen von Substituenten auf die Säurelabilität wurden durchgeführt (A. Taunton-Rigby et al., J. Org. Chem. 37:956-964 (1972)). Eine geeignete Substitution liefert die 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylgruppe und die 9-Phenylxanthen-9-yl-gruppe, die eine optimale Säurelabilität für gegenwärtige Oligonucleotidsyntheseanwendungen besitzen. Darüber hinaus wurden mehrere säurestabile Tritylderivate, die den gewünschten hydrophoben Charakter und die 5'-Regioselektivität beibehalten, hergestellt. Beispiele hierfür sind 4,4',4"-Tris(4,5-dichlorphthalimido)-trityl (M. Sekine und T. Hata, J. Am. Chem. Soc. 106:5764-5765 (1984)); 4,4',4"-Tris(levulinyloxy)trityl (M. Sekine und T. Hata, Bull. Chem. Soc. Jpn., 58:336-339 (1985)), 4-(9-Fluorenylmethyloxycarbonyl)oxy-4',4"-dimethoxytrityl (E. Happ und C.S. Happ, Nucleosides and Nucleotides 7:813-816 (1988)) und 4-(9-Fluorenylmethyloxycarbonyl)amino-4',4"-dimethoxytrityl (aaO). Alle diese Verbindungen sind substituierte Triphenylmethylderivate mit einer oder mehreren geschützten Phenol- oder exocyclischen Aminogruppen. Während die Phenol- oder exocyclische(n) Aminogruppe(n) geschützt bleibt (bleiben), ist die Trityletherbindung gegenüber sauren Bedingungen ziemlich stabil. Bei Hydrazinolyse der Levulinylschutzgruppen, Hydrazinolyse der 4,5-Dichlorphthalimidenschutzgruppen oder alkalikatalysierter beta-Eliminierung der 9-Fluorenylmethyloxycarbonyl(Fmoc)-gruppe werden alle phenolischen Gruppen oder exocyclischen Aminogruppen regeneriert. Die Etherbindung der erhaltenen Tritylspezies kann anschließend mit einer schwachen Säure rasch gespalten werden. Tritylderivate, die bisher beschrieben wurden, dienten streng als Schutzgruppen mit unüblichen Labilitätseigenschaften.

Als Werkzeuge für eine affinitätschromatographische Reinigung von Oligonucleotiden wurden Triphenylmethylschutzgruppen mit langkettigen Alkylsubstituenten hergestellt (H. Seliger und H.H. Gortz, Angewandte Chemie 93:709 (1981); H. Seliger und H.H. Gortz, Angewandte Chemie Inter. Ed. Engl. 20:683 (1981); M. Kwiatkowski et al., Acta. Chem. Scand. B38:657 (1984); G. Schmidt et al., Nucleosides and Nucleotides 7:795-799 (1988)). Durch Einführen von Triphenylmethylschutzgruppen mit langkettigen Alkylsubstituenten in das 5'-Hydroxylende von Oligodesoxynucleotiden kann eine stärkere Affinität der die vollständige Länge aufweisenden DNA-Produkte für hydrophobe chromatographische Träger erreicht werden. Derartige Derivate eignen sich insbesondere zur Reinigung von Oligonucleotiden mit einer Länge von mehr als 60 Nucleotiden. Die Herstellung von mit langkettigen Alkylgruppen substituierten Triphenylmethylderivaten und der vier geeignet geschützten synthetischen Monomere ist schwierig und arbeitsintensiv. Diese Monomere werden für eine einzelne Kondensationsreaktion bei einer Oligonucleotidsynthese verwendet.

In jüngster Zeit wurde die nichtisotopische Markierung von Oligodesoxynucleotiden unter Verwendung von Biotin und Fluorophoren zum Nachweis von auf festen Trägern immobilisierter DNA (S. Beck et al., Nucl. Acids Res. 17:5115-5123 (1989); T. Takahashi et al., Anal. Biochem. 179:77-85 (1989)); zur Immobilisierung von DNA an festen Trägern (A. Syvanen et al., Nucl. Acids Res. 16:11327-11338 (1988); R.W. Richardson und R.I. Gumpert, Nucl. Acids Res. 11:6167-6184 (1983)); zur Affinitätsreinigung von DNA (L.G. Mitchell und C.R. Merrill, Anal. Biochem. 178, 239-242 (1989); B.A. Dawson et al., J. Biol. Chem. 264, 12830-12837 (1989)) und/oder zur Sequenzierung von DNA (Beck, aaO; Mitchell et al., aaO; L.M. Smith, Nature 321:674-679 (1986)) stetig geeigneter. Biotin und Fluorophore wurden im Rahmen zahlreicher chemischer Verfah-

ren in synthetische Nucleinsäurefragmente eingebaut (S. Agrawal et al., Nucl. Acids Res. 14:6227-6245 (1986), A.C. Forster et al., Nucl. Acids Res. 13:745-761 (1985); J.M. Coull et al., Tett. Lett. 27: 3991-3994 (1986); K.J. Gibson und S.J. Benkovic, Nucl. Acids Res. 15:6455-6467 (1987)).

Ein chemischer Zusammenbau von Oligonucleotiden ist gut untersucht und wurde im Rahmen eines Phosphodiester-, Phosphotriester-, Phosphoramidat-, Phosphoramidit- und H-Phosphonatverfahrens durchgeführt (vgl. M.J. Gait, Oligonucleotide Synthesis, A Practical Approach, IRL Press Inc., Oxford, England). Die üblichste Maßnahme, mit der Oligonucleotide hergestellt werden, ist die Festphasensynthese unter Verwendung der 2-Cyanoethylphosphoramidite (N.D. Sinha et al., Nucleic Acids Research, 12:4539-4557 (1984) und US-A-4 725 677, der Millipore Corporation). Zur Markierung von DNA wurden verschiedene geeignet geschützte Aminogruppen enthaltende Nucleosidderivate (J. Haralambidis et al., Nucl. Acids Res. 15:4857-4876 (1987); K.J. Gibson aaO, L.M. Smith et al., Nucl. Acids Res. 13: 2399-2412 (1985)), thiolgruppenhaltige Nucleosidderivate (B.S. Sproat et al., Nucl. Acids Res. 15:4837-4848 (1987)) und 5'-terminale Linker (S. Agrawal, aaO; J.M. Coull et al., aaO; B.A. Connolly, Nucl. Acids Res. 15:3131-3139 (1987); R. Blanks und L.M. McLaughlin, Nucl. Acids Res. 16:2659-2669 (1988); B.A. Connolly und P. Ridge, Nucl. Acids Res. 13:4485-4502 (1985)) hergestellt. Alle diese Synthone werden während eines chemischen Zusammenbaus ohne Schwierigkeiten in Oligodesoxynucleotide eingebaut. Alle diese Linker können zur Einführung einer Markierung in das Oligonucleotid weiter umgesetzt werden. Die Linker können jedoch nicht unter Bildung eines natürlichen (nicht modifizierten) Oligonucleotids entfernt werden.

Ein zur exponentiellen in vitro Vermehrung einer Nucleinsäuresequenz verwendetes Verfahren ist die Polymerasekettenreaktion (PCR) (US-A-4 683 202 der Cetus Corporation). Das

Verfahren bedient sich zweier kurzer Oligonucleotidprimer, die zu verschiedenen Strängen einer DNA-Matrize komplementär sind und den zur vervielfältigenden Bereich der Nucleinsäuresequenz flankieren. Unter Verwendung einer thermostabilen DNA-Polymerase und wiederholter Zyklen einer Matrizendenaturierung, einer Primeranhybridisierung und Primerextension ist es möglich, rasch große Mengen einer definierten Nucleinsäuresequenz aus einigen oder sogar einer einzigen Matrizenkopie herzustellen. Die flankierenden Sequenzen müssen jedoch zuerst bestimmt werden, um komplementäre Primer herzustellen.

Bei der PCR verwendete Primer werden in das 5'-Hydroxylende der vermehrten Produkte eingebaut. Wenn einer oder beide Primer in einer Weise markiert sind, daß sie eine Primeranhybridisierung und Primerextension nicht stören, ist es unvermeidbar, daß das vermehrte Produkt die Markierung enthält. Es wäre wünschenswert, Oligonucleotidprimer chemisch zusammenzufügen, in denen die Markierung später unter Bildung einer nicht modifizierten DNA entfernt werden kann.

Die Immobilisierung von durch PCR vermehrten Produkten an einem festen Träger wurde unter Verwendung von mit Biotin markierten Primern und eines Streptavidinagaroseträgers durchgeführt (L.G. Mitchell et al., Anal. Biochem. 178:239-242 (1989)). Wenn ein einzelner markierter Primer verwendet wird, war es möglich, das immobilisierte doppelsträngige Produkt zu denaturieren und die aus dem nichtmarkierten Primer hervorgegangene einzelsträngige Sequenz zu isolieren. Die Affinität des Biotin/Streptavidin-Komplexes ist jedoch so groß (es wird berichtet, daß der  $K_d$ -Wert  $10^{-15}$  beträgt), daß es im wesentlichen unmöglich ist, den mit Biotin markierten Strang von dem Träger zu entfernen. Dadurch wird die Isolierung des doppelsträngigen Produkts gestört. Darüber hinaus wäre es auf der Basis der durch die gegenwärtige Oligonucleotidsynthese und die Chemie der Markierung ge-

schaffenen Beschränkungen wünschenswert, ein Verfahren zu haben, bei dem Biotin aus der vermehrten DNA abgespalten werden kann, so daß das nicht modifizierte doppelsträngige Produkt erhalten werden kann.

5

#### Zusammenfassung der Erfindung

Die vorliegende Erfindung betrifft heterobi- oder oligofunktionelle Schutzgruppen, bei denen mindestens zwei Funktionalitäten regioselektiv oder chemoselektiv an funktionelle Gruppen an einem natürlichen Produkt, Biopolymer oder Synthon für ein natürliches Produkt oder Biopolymer, beispielsweise ein Oligonucleotid, eine Nucleinsäure, ein Nucleosid, ein Nucleotid, eine Aminosäure, Monosaccharide, Oligosaccharide, Peptide; Proteine, Kohlenhydrate, Lipide, Steroide oder Alkaloide, binden können. Die Schutzgruppen liefern ein Mittel, um reversibel eine modifizierende Gruppe an das natürliche Produkt, Biopolymer oder Synthon zu binden. Das Biopolymer, natürliche Produkt oder Synthon kann durch einfaches Entfernen der Schutzgruppe in der ursprünglichen Form regeneriert werden. Im allgemeinen umfaßt die Schutzgruppe eine regioselektive oder chemoselektive Funktionalität und eine oder mehrere weitere Funktionalitäten, die an eine modifizierende Einheit, die unter einer nachweisbaren Markierung, einem biologisch aktiven Molekül oder einer Verbindung zur Unterstützung bei der Reinigung des natürlichen Produkts, Biopolymers oder Synthons ausgewählt ist, binden können, wobei gilt, daß die Funktionalität keine Phenol(hydroxyl)gruppe oder Arylaminogruppe ist und die modifizierende Einheit keine 9-Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc)-, Levulino- oder 4,5-Dichlorphthalimidogruppe ist. Vorzugsweise ist die Schutzgruppe ein Triphenylmethylderivat, beispielsweise 4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl oder Pixyl.

35

Die vorliegende Erfindung betrifft auch ein reversibel modifiziertes natürliches Produkt, Biopolymer oder Synthon, das durch die folgende Formel dargestellt werden kann:

5

L-P-C\*

10

15

worin C\* für ein natürliches Produkt, Biopolymer oder Synthon für ein Biopolymer oder ein natürliches Produkt steht, P eine an eine funktionelle Gruppe von C\* gebundene Schutzgruppe, die von der geschützten funktionellen Gruppe unter derartigen Bedingungen, daß die funktionelle Gruppe regeneriert wird, entfernt werden kann, bedeutet und L eine Funktionalität zur Bindung einer modifizierenden Einheit an P bedeutet, wobei gilt, daß L nicht für eine Phenol(hydroxyl)gruppe oder eine Arylaminogruppe steht.

20

25

30

Die heterobi- oder oligofunktionellen Schutzgruppen der vorliegenden Erfindung können als Träger zur reversiblen Bindung eines natürlichen Produkts, Biopolymers oder Synthons an der modifizierenden Einheit verwendet werden. Obwohl eine oder mehrere Funktionalitäten an C\* durch P geschützt werden, lassen sich die verschiedensten chemischen Manipulationen durchführen. Beispielsweise können einzelsträngige und doppelsträngige Nucleinsäuren gereinigt und nachfolgend in ihrer natürlichen Form isoliert werden. In ähnlicher Weise können verschiedene natürliche Produkte gleichzeitig mit Hilfe der hier beschriebenen Verfahren und Verbindungen voneinander gereinigt und getrennt werden. In einer Ausführungsform können modifizierte Oligonucleotide als Primer für Polymerasekettenreaktionen verwendet werden.

#### Kurze Beschreibung der Zeichnungen

35

Es zeigen:



Fig. 1 eine schematische Darstellung der Synthese einer modifizierten Triphenylmethylschutzgruppe und eines damit geschützten Nucleosids;

5 Fig. 2 eine Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)-Analyse eines rohen, teilweise geschützten, mit Fluorescein markierten Polymerasekettenreaktion (PCR)-Primers 1;

10 Fig. 3 eine Umkehrphasen-HPLC-Analyse eines Rohgemisches mit sieben teilweise geschützten Oligonucleotiden und

Fig. 4 ein mit Ethidiumbromid angefärbtes Elektrophoresegel, das aus der Analyse verschiedener Proben erhalten wird.

15

#### Detaillierte Beschreibung der Erfindung.

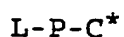
20 Die vorliegende Erfindung betrifft Verbindungen, die sowohl als Schutzgruppe zum Schutz einer funktionellen Gruppe an einem natürlichen Produkt, Biopolymer oder Synthon für ein natürliches Produkt oder Biopolymer als auch als Verbindungsgruppe zum Binden einer modifizierenden Einheit daran dienen. Die erfindungsgemäßen Verbindungen sind heterobi- oder oligofunktionelle Schutzgruppen, bei denen mindestens  
25 eine Funktionalität regioselektiv oder chemoselektiv an eine funktionelle Gruppe des natürlichen Produkts, Biopolymers oder Synthons bindet. Sie können jedoch von der geschützten funktionellen Gruppe unter derartigen Bedingungen entfernt werden, daß die ursprüngliche funktionelle Gruppe regeneriert wird.  
30

35 Heterobi- oder oligofunktionelle Schutzgruppen lassen sich durch die Formel L-P, worin P für eine Schutzgruppe zum Schutz einer funktionellen Gruppe an dem natürlichen Produkt, Biopolymer oder Synthon steht, darstellen. Beispielsweise kann P zum Schutz von Hydroxyl-, Amino- oder Thiol-

funktionalitäten verwendet werden. Die Schutzgruppe kann von der geschützten funktionellen Gruppe unter derartigen Bedingungen entfernt werden, daß die ursprüngliche funktionelle Gruppe regeneriert wird. Vorzugsweise ist P eine regioselektive Schutzgruppe, beispielsweise eine Trityl-, 4-Monomethoxytrityl-, 4,4'-Dimethoxytrityl- oder Pixylgruppe. Es können jedoch auch in Abhängigkeit von der Funktionalität am natürlichen Produkt, Biopolymer oder Synthon, das geschützt werden soll, andere Schutzgruppen verwendet werden. P kann auch Benzyl, beispielsweise Methoxybenzyl, Nitrobenzyl, Alkoxybenzyl, Dialkoxybenzyl, Benzyloxycarbonyl, beispielsweise Methoxybenzyloxycarbonyl, Benzyloxymethyl, beispielsweise Nitrobenzyloxymethyl, Methoxybenzyloxymethyl, Alkoxy-carbonyl, beispielsweise tert.-Butoxycarbonyl, Alkoxy-methyl, beispielsweise Methoxymethyl, Alkylsilyl, beispielsweise tert.-Butyldimethylsilyl, Arylsilyl, beispielsweise Triphenylsilyl, Benzoyl, beispielsweise Nitrobenzoyl, Alkoxybenzoyl, Phenoxyacetyl oder Alkoxyacetyl sein. Jede dieser Schutzgruppen kann substituiert sein. Beispielsweise ist eine bevorzugte Schutzgruppe zur Peptidsynthese 9-Fluorenylmethoxy-carbonyl.

L ist eine Funktionalität an der Schutzgruppe zur Bindung oder Verknüpfung einer modifizierenden Einheit damit, wobei gilt, daß L nicht für eine Phenyl(hydroxyl)gruppe oder eine Arylaminogruppe steht. An dieser Stelle können eine Reaktion, Verlängerung, der Einbau einer weiteren funktionellen Gruppe oder eine Markierung durchgeführt werden, da L eine reaktive Gruppe ist.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch reversibel modifizierte natürliche Produkte, Biopolymere oder Synthone, die durch die folgende Formel dargestellt werden können:



worin C\* für ein synthetisches Biopolymer, Synthon, natürliches Produkt oder irgendeine Modifikation hiervon steht. C\* kann auch ein Nucleosid, Nucleotid, Oligonucleotid, eine Nucleinsäure, ein Aminosäurepeptid, Protein, Monosaccharid, Oligosaccharid, Kohlenhydrat, Steroid, Lipid oder Alkaloid sein. Ein Anfügen einer modifizierenden Einheit an L führt zu einer Verbindung, die durch die folgende Formel M-L-P-C\* mit M gleich der modifizierenden Einheit dargestellt werden kann. Wenn das Produkt M-L-P-C\* Bedingungen unterworfen wird, die sich zur Entfernung der Schutzgruppe eignen, wird die ursprüngliche entschützte funktionelle Gruppe der Verbindung C\* zusammen mit dem Nebenprodukt M-L-P erzeugt.

Die modifizierende Einheit M stellt entweder die ursprüngliche modifizierende Einheit oder irgendeine Modifikation hiervon dar. M kann ein Mittel zum Nachweis und/oder zur Reinigung von C\* beispielsweise durch Affinitäts- oder Nichtaffinitätsreinigungsverfahren sein. M kann auch als ein Mittel zum Anheften von C\* an einen festen Träger sein. Folglich kann M eine Alkyleinheit, eine Hydroxyalkyleinheit, eine Carboxyalkyleinheit, eine Aminoalkyleinheit, eine Thioalkyleinheit, eine nachweisbare Markierung, beispielsweise ein Radioisotop, Fluorophor, eine lumineszente Verbindung, eine chemilumineszente Verbindung oder Biotin, ein Affinitäts- oder Reinigungshilfsmittel, beispielsweise lange Alkylketten, Polymere oder biologische Moleküle, ein biologisch aktives Molekül, beispielsweise ein Peptid, ein Protein, ein Nucleosid, ein Nucleotid, ein Oligonucleotid, eine Nucleinsäure, ein Zuckermolekül, ein Oligosaccharid, ein Kohlenhydrat, eine Steroid, ein Lipid oder Alkaloid, oder ein Polymer sein, wobei gilt, daß M nicht für eine 9-Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc)-, Levulinoyl- oder 4,5-Dichlorphthalimidogruppe steht. Wenn M beispielsweise eine nachweisbare Markierung ist, ist es möglich, den Komplex M-L-P-C\* durch geeignete Maßnahmen nachzuweisen. Eine Entschützung führt zur Wiedererzeugung der Verbindung C\* und des markier-

ten Nebenprodukts M-L-P. Eine Entfernung der Schutzgruppe kann gegebenenfalls nach der Trennung, Isolierung, dem Nachweis und/oder der Reinigung des Komplexes durchgeführt werden.

5

Wenn M eine Verbindung zur Unterstützung bei der Reinigung oder Immobilisierung von  $C^*$ , beispielsweise ein Reinigungs- oder Affinitätshilfsmittel, ist, ist es möglich, den Komplex M-L-P- $C^*$  über einen festen Träger zu führen, um den Komplex am Träger zum Zwecke einer Immobilisierung und/oder Reinigung selektiv zu adsorbieren oder covalent zu binden. Im Falle, daß der Komplex M-L-P- $C^*$  vom Träger eluiert werden kann, ist es möglich, das gereinigte Produkt zu sammeln.

10

Eine Entfernung der Schutzgruppe unter im Vorhinein definierten Bedingungen liefert  $C^*$  und das Nebenprodukt M-L-P. Wenn der Komplex M-L-P- $C^*$  über die modifizierende Einheit M fest am Träger immobilisiert wird, läßt sich die neue Spezies als S-M-L-P- $C^*$  definieren, wobei S der Träger ist.  $C^*$  kann anschließend vom Nebenprodukt S-M-L-P unter zur Entfernung der Schutzgruppe bekannten Bedingungen, beispielsweise durch Säurebehandlung, abgetrennt werden.

15

20

Eine oder mehrere chemische oder enzymatische Manipulationen der Verbindung  $C^*$  des Komplexes M-L-P- $C^*$  können durchgeführt werden, um eine als  $C^*$  definierte modifizierte Verbindung herzustellen. Obwohl  $C^*$  zuvor so definiert wurde, daß sie modifizierende Versionen von  $C^*$  umfaßt, steht zur Veranschaulichung  $C^*$  für eine oder mehrere Modifikationen. Der erhaltene Komplex, der als M-L-P- $C^*$  definiert ist, vermag  $C^*$  und ein Nebenprodukt M-L-P zu bilden, wenn der Komplex Bedingungen ausgesetzt wird, die ausreichen, um die Schutzgruppe zu entfernen. In ähnlicher Weise können eine oder mehrere chemische oder enzymatische Manipulationen an M im Komplex M-L-P- $C^*$  durchgeführt werden. Derartige Manipulationen können vor oder nach einer chemischen oder enzymatischen Manipulation von  $C^*$  durchgeführt werden. In ähnlicher Weise

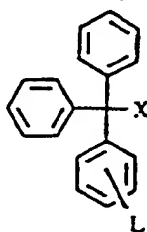
25

30

35

kann M-L-P aus C\* oder C\*' unter zur Entfernung der Schutzgruppe geeigneten Bedingungen entfernt werden.

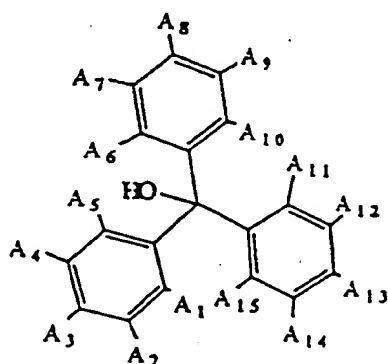
Eine bevorzugte Schutzgruppe ist ein Triphenylmethylderivat, das derart modifiziert ist, daß es an C\* zum Schutz desselben und an eine modifizierende Einheit, beispielsweise eine Markierung, an einer oder mehreren weiteren funktionellen Gruppen an den Phenyleinheiten zu binden vermag. Im allgemeinen werden heterobi- oder oligofunktionelle Triphenylmethylschutzgruppen der vorliegenden Erfindung durch die folgende Formel dargestellt:



Wenn C\* beispielsweise ein Nucleosid, Nucleotid oder Oligonucleotid ist, kann die Triphenylmethylschutzgruppe (P) an der 5'-Hydroxylgruppe, der Nucleosidbase oder der 3'-Hydroxylgruppe an C\* gebunden werden. Vorzugsweise wird P an der 5'-Hydroxylgruppe gebunden. C\* kann von dem Komplex an der Schutzgruppe abgespalten werden, um hierbei die ursprüngliche nicht geschützte biologische Verbindung zu bilden. Somit können biologische Verbindungen von Interesse von Markierungen oder anderen modifizierenden Einheiten entfernt werden, ohne daß ihre Strukturen infolge des Entfernungsvorgehens verändert werden. Bevorzugte Triphenylmethylderivate und Verfahren zur Herstellung derselben sind im folgenden detailliert beschrieben.

In einer Ausführungsform wird ein substituiertes Triphenylhydroxymethylderivat mit einer einzelnen oder mehreren exocyclischen Carbonsäure-, Sulfonsäure-, Cyano-, Nitro- oder anderen funktionellen Gruppen der allgemeinen Formel (Ia)

hergestellt. In ähnlicher Weise wird ein substituiertes Triphenylhydroxymethylderivat mit einer einzelnen oder mehreren exocyclischen Alkylcarbonsäure-, Alkylsulfonsäure-, Cyanoalkyl-, Nitroalkyl- oder weiteren funktionellen Alkylgruppen der allgemeinen Formel (Ia) hergestellt.



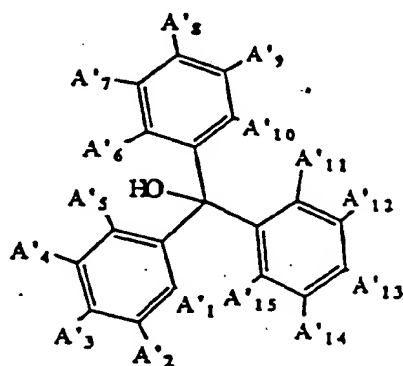
Ia

worin  $A_1$ - $A_{15}$  gleich oder verschieden sind und unter H, R, OR und Z ausgewählt sind, wobei gilt, daß mindestens eine Gruppe Z vorhanden ist; R für eine Alkylgruppe mit 1 bis 20 Kohlenstoffatom(en), beispielsweise eine Methyl-, Ethyl-, 2-Propyl-, Butyl-, tert.-Butyl, 2-Cyanoethylgruppe, die gegebenenfalls durch ein oder mehrere Heteroatome, beispielsweise eine Cyano-, Nitro- oder Halogengruppe, substituiert ist oder eine substituierte oder nichtsubstituierte Arylgruppe, beispielsweise Phenyl-tert.-butylphenylgruppe, steht und Z  $-(CH_2)_n C(O)OH$ ,  $-(CH_2)_n SO_3H$ ,  $-(CH_2)_n NO_2$ ,  $-(CH_2)_n CN$ ,  $-(CH_2)_n OH$ ,  $-(CH_2)_n NH_2$  oder  $-(CH_2)_n SH$  mit n gleich einer ganzen Zahl von 0 bis 20 bedeutet, wobei gilt, daß, wenn n gleich 0 ist, Z für eine von  $-OH$  oder  $NH_2$  verschiedene Gruppe steht.

Ein bevorzugtes Derivat der obigen Verbindung ist die in Fig. 1 dargestellte 4',4"-Dimethoxytriphenylhydroxymethylverbindung (Verbindung Ib). Gemäß Fig. 1 kann die Verbindung

durch Umsetzen eines Grignard-Reagens (hergestellt aus 2-(4-Bromphenyl)-4,4-dimethyl-1,3-oxazolin und Magnesium) mit einem substituierten oder nichtsubstituierten Benzophenon unter Bildung eines substituierten oder nichtsubstituierten Triphenylmethylderivats hergestellt werden. Diese Verbindung wird anschließend nacheinander mit wäßriger Säure, Base und Säure unter Bildung der Verbindung Ib behandelt.

Die exocyclische(n) funktionelle(n) Gruppe(n) der Verbindungen der allgemeinen Formel (Ia) wird (werden) in eine Verbindung der allgemeinen Formel (IIa) umgewandelt. In einer Ausführungsform wird die exocyclische funktionelle Gruppe in eine Verbindung mit einer exocyclischen elektrophilen funktionellen Gruppe, beispielsweise einen N-Hydroxysuccinimidester, einen 2-Nitrophenylester, einen 4-Nitrophenylester, einen 2,4-Dichlorphenylester, einen anderen beliebigen aktiven Ester, ein Acylhalogenid, ein Acylazolid, ein Alkylhalogenid, ein Sulfonylhalogenid oder irgendein anderes beliebiges reaktives Halogenidderivat, umgewandelt. Vorzugsweise ist die Verbindung das in Fig. 1 dargestellte N-Succinimidyl-4-[bis(4-methoxyphenyl)-hydroxymethyl]benzoat (IIb).

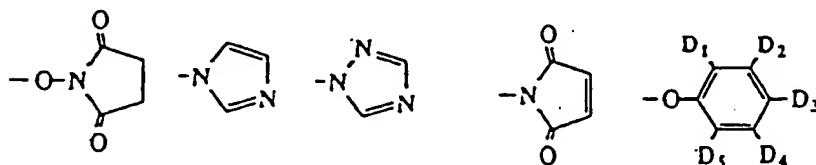


IIa

5

worin  $A'_1-A'_{15}$  gleich oder verschieden sind und unter H, R, OR, Z und L ausgewählt sind, wobei gilt, daß mindestens eine Gruppe L vorhanden ist, R und Z die oben angegebene Bedeutung besitzen, L  $-(CH_2)_n C(O)W$ ,  
 10  $-(CH_2)_n SO_2W$ ,  $-(CH_2)_n W$  mit n gleich einer ganzen Zahl von 0 bis 20 bedeutet und W unter Cl, Br, I, -NCS, -NCO,

15



20

mit  $D_1-D_5$ , die gleich oder verschieden sind, jeweils gleich H, F, Cl, Br, I,  $-NO_2$  oder  $-CN$  ausgewählt ist.

25

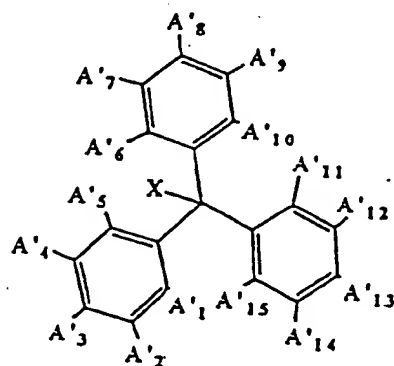
30

35

Anschließend kann aus Verbindungen der allgemeinen Formel IIa ein substituiertes Triphenylhalogenmethyl- oder Triphenyltetrafluorboranmethylderivat mit einer oder mehreren exocyclischen reaktiven Stellen der allgemeinen Formel IIIa hergestellt werden. Beispielsweise kann ein Triphenylhalogenmethyl- oder Triphenyltetrafluorboranmethylderivat mit mindestens einer weiteren exocyclischen elektrophilen funktionellen Gruppe hergestellt werden. Diese Verbindungen sind regioselektive dielektrophile Triphenylmethylderivate. Bevorzugte exocyclische elektrophile funktionelle Gruppen umfassen den N-Hydroxysuccinimidylester, 2-Nitrophenylester, 4-Nitrophenylester, 2,4-Dichlorphenylester, einen beliebigen aktiven Ester, ein Acylhalogenid, ein Acylazolid, ein Alkylhalogenid, ein Sulfonylhalogenid oder ein beliebiges reaktives Halogenidderivat. In einer bevorzugten Ausführ-



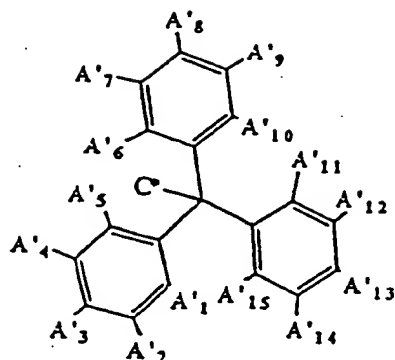
rungsform ist die Verbindung N-Succinimidyl-4-[bis(4-methoxyphenyl)-chlormethyl]-benzoat (IIIb), das in Fig. 1 dargestellt wird.



IIIa

worin A'<sub>1</sub>-A'<sub>15</sub> die oben angegebene Bedeutung besitzen und X für eine Abgangsgruppe, beispielsweise Cl, Br, I oder BF<sub>4</sub>, steht.

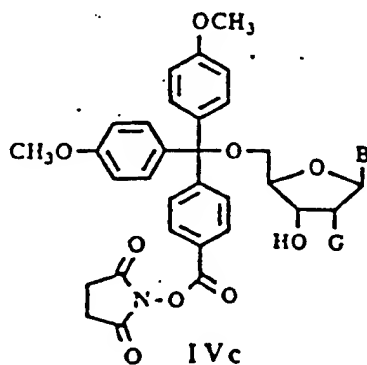
Einen regioselektiven Schutz einer funktionellen Gruppe an einem natürlichen Produkt, Biopolymer oder Synthon für ein natürliches Produkt oder Biopolymer erreicht man durch bevorzugte Umsetzung an der sterisch gehinderten kationischen Stelle von Verbindungen der allgemeinen Formel IIIa unter Bildung einer Verbindung der allgemeinen Formel IVa. Beispielsweise wird die 5'-Hydroxylgruppe eines Ribonucleosids oder 2'-Desoxyribonucleosids vorzugsweise mit den Triphenylmethylderivaten der allgemeinen Formel IIIa unter Bildung teilweise geschützter Nucleosidderivate der allgemeinen Formel IVa geschützt.



IVa

worin A'<sub>1</sub>-A'<sub>15</sub> die oben angegebene Bedeutung besitzen und C\* unter einem Nucleosid, Nucleotid, Oligonucleotid, einer Nucleinsäure, einer Aminosäure, einem Peptid, Protein, Monosaccharid, Oligosaccharid, Kohlenhydrat, Lectin, Lipid, Steroid, Alkaloid oder einem Biopolymer ausgewählt ist.

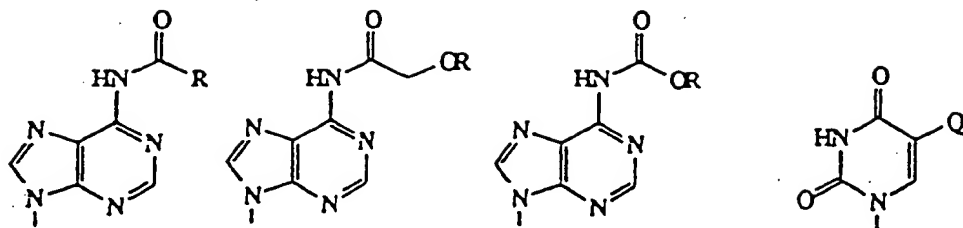
Bevorzugte Verbindungen der Formel IVa sind N-Succinimidyl-4-[bis(4-methoxyphenyl)-5'-O-(2'-desoxyribonucleosidyl)-methyl]-benzoat (IVb1-4; Fig. 1) und N-Succinimidyl-4-[bis(4-methoxyphenyl)-5'-O-(ribonucleosidyl)-methyl]-benzoat. Diese Verbindungen können durch die Formel IVc dargestellt werden.



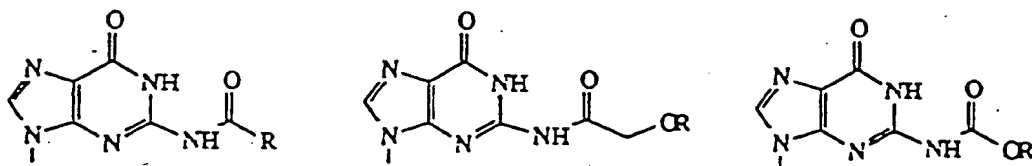
IVc

worin B für eine Nucleosidbase steht, die mit Hilfe einer eliminierbaren Base (H. Köster et al., Tetrahedron 37:363-369 (1981)) geschützt und aus den folgenden Gruppen ausgewählt werden kann:

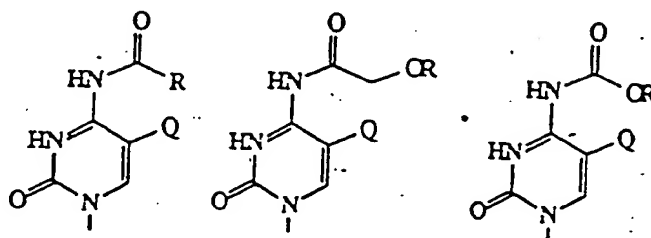
5



10

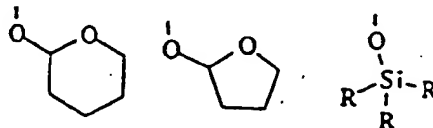


15



20

mit Q gleich H oder Methyl,  
G gleich H, OH, OR,  
und



R in der oben angegebenen Bedeutung.

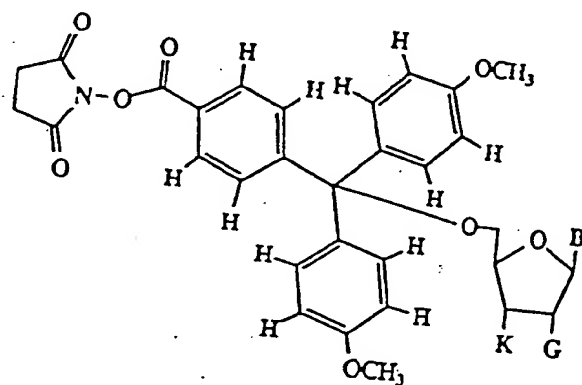
25

30

35

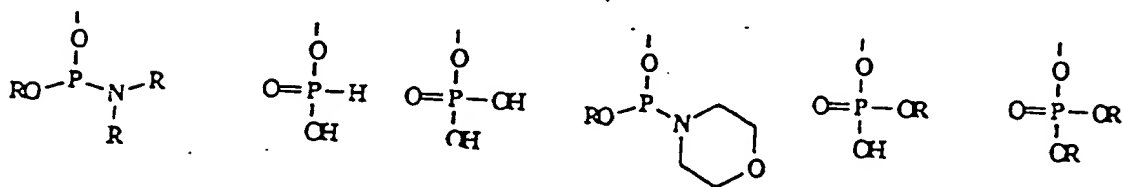
Zur Herstellung der vollständig geschützten Nucleosidderivate wird die 3'-Hydroxylgruppe der teilweise geschützten Nucleosidderivate der allgemeinen Formel IVc mit einer aktivierten phosphorhaltigen Verbindung umgesetzt. Vollständig geschützte Nucleosidderivate, die aus dieser Reaktion hervorgehen, lassen sich durch die Formel Va darstellen. Verbindungen dieser Formel eignen sich zur nachfolgenden Kondensation mit einer Hydroxylgruppe unter den für eine Oligonucleotidsynthese allgemein verwendeten Bedingungen. Verwendbare aktivierte Phosphorverbindungen umfassen - ohne darauf begrenzt zu sein - 2-Cyanoethylphosphoramidite (US-A-

4 725 677), O-Methylphosphoramidite (US-A-4 458 066), H-Phosphonatsynthese, Phosphotriestersynthese und Phosphodi-  
estersynthese. Zwei Beispiele für vollständig geschützte  
Nucleosidderivate sind N-Succinimidyl-4-[bis(4-methoxyphenyl)-5'-O-(3'-O-(N,N-diisopropylamino-2-cyanoethylphosphi-  
nyl)-ribonucleosidyl)-methyl]-benzoate und N-Succinimidyl-4-  
[bis(4-methoxyphenyl)-5'-O-(3'-O-(N,N-diisopropylamino-2-  
cyanoethylphosphinyl)-2'-desoxyribonucleosidyl)-methyl]-ben-  
zoate, die in Fig. 1 dargestellt sind (Fig. Vb<sub>1-4</sub>).



Va

worin K für H, OH,



steht und R, B und G die oben angegebene Bedeutung be-  
sitzen.

Vollständig geschützte Verbindungen, beispielsweise die in  
Fig. 1 dargestellten, können vor einem Binden einer modi-  
fizierenden Einheit an die Schutzgruppe weiter verlängert  
werden. Beispielsweise können diese Verbindungen mit der 5'-

Hydroxylgruppe eines teilweise geschützten und zusammenge-  
 bauten Oligonucleotids entweder in Lösung oder im Rahmen  
 eines Festphasenverfahrens unter Bildung vollständig ge-  
 schützter Oligonucleotide mit einer oder mehreren reaktiven  
 5 verknüpfenden Gruppen (L) an der Schutzgruppe (P) konden-  
 siert werden. Die Schutzgruppe, die die reaktive(n) ver-  
 knüpfende(n) Gruppe(n) (L) trägt, wird hierbei an das 5'-  
 Hydroxylende des Oligonucleotids gebunden.

10 Geschützte Verbindungen der allgemeinen Formel L-P-C\* können  
 an der reaktiven Funktionalität (L) der Schutzgruppe/verbin-  
 denden Gruppe P-L modifiziert werden. Das Produkt dieser Mo-  
 difizierung wurde oben als M-L-P-C\* mit M gleich der Modi-  
 fizierung, die durch eine oder mehrere Manipulationen an der  
 15 reaktiven funktionellen Gruppe (L) der Schutzgruppe oder ir-  
 gendwelche Manipulationen einer ursprünglichen Modifizierung  
 gebildet wird, definiert.

20 In einer Ausführungsform ist die Verbindung C\* ein Nucleo-  
 sid, ein Oligonucleotid oder eine Nucleinsäure und die aus  
 der Schutzgruppe/verbindenden Gruppe bestehende Einheit P-L  
 ein Triphenylmethylderivat der Formel IIIa. In einer weite-  
 ren Ausführungsform ist die Verbindung C\* ein an einen Trä-  
 ger gebundenes Oligonucleotid, das über eine säurelabile  
 25 Etherbindung an eine 4,4'-Dimethoxy-substituierte Triphenyl-  
 methylschutzgruppe/verbindende Gruppe P-L gebunden ist (be-  
 vorzugte Ausführungsform der allgemeinen Formel IIIb). M ist  
 eine oben definierte Gruppe.

30 Verbindungen der allgemeinen Formel M-L-P-C\* können unter  
 Bildung von C\* und des Nebenprodukts M-L-P entschützt wer-  
 den. Im Falle, daß C\* ein Oligonucleotid ist, ist es mög-  
 lich, die Verbindung C\* des Komplexes M-L-P-C\* weiter zu ma-  
 nipulieren. In einer Ausführungsform sind die Verbindung C\*  
 35 ein vollständig geschütztes und an einen Träger gebundenes  
 Oligonucleotid, P-L ein heterobifunktionelles Triphenylme-

thylderivat der allgemeinen Formel IIIa (das Oligonucleotid ist durch P in Form eines durch eine Säure abspaltbaren Ethers geschützt) und M eine modifizierende Einheit, die die oben beschriebenen Gruppen umfassen und gegebenenfalls geschützt sein kann. Der Komplex M-L-P-C\* kann von dem Träger abgespalten und teilweise unter Verwendung von auf dem Gebiet der Oligonucleotidsynthese im allgemeinen verwendeten Verfahren teilweise entschützt werden. In einer Endstufe kann die modifizierte eine schützende Gruppe bildende Verbindungsgruppe P-L unter Bildung eines vollständig entschützten Oligonucleotids und eines Nebenprodukts der allgemeinen Formel M-L-P entfernt werden.

Teilweise geschützte Oligonucleotide können vor einer vollständigen Entschätzung weiteren anderen Manipulationen unterzogen werden. Diese umfassen weitere Manipulationen von M und/oder eine Immobilisierung des Oligonucleotids an einem Träger über die Modifizierung M. In einer bevorzugten Ausführungsform sind P-L ein heterobifunktionelles Triphenylmethylderivat der allgemeinen Formel IIIa (das Oligonucleotid ist durch P in Form eines durch eine Säure abspaltbaren Ethers geschützt) und M eine Hydroxyalkyleinheit, eine Carboxyalkyleinheit, eine Aminoalkyleinheit oder eine Thioalkyleinheit. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform sind C\* ein teilweise geschütztes Oligonucleotid, P-L ein heterobifunktionelles Triphenylmethylderivat der allgemeinen Formel IIIb (das Oligonucleotid ist durch P in Form eines durch eine Säure abspaltbaren Ethers geschützt) und M eine Aminoalkyleinheit.

Gemäß dem Verfahren kann ein Oligonucleotid über die Hydroxylgruppe, Carboxylgruppe, Aminogruppe oder Thiolgruppe der Modifikation M markiert werden. Geeignete nachweisbare Markierungen umfassen ein Radioisotop, ein Fluorophor, eine lumineszente Verbindung oder eine chemilumineszente Verbindung, Biotin, ein Affinitäts- oder Reinigungshilfsmittel,

beispielsweise lange Alkylketten oder Polymere, oder ein biologisch aktives Molekül, beispielsweise ein Peptid, ein Protein, ein Nucleosid, ein Nucleotid, ein Oligonucleotid, eine Nucleinsäure, ein Monosaccharid, ein Oligosaccharid, ein Steroid, ein Lipid, ein Alkaloid oder ein Kohlenhydrat. Vorzugsweise ist die nachweisbare Markierung Biotin oder ein Fluorophor.

Der Komplex M-L-P-C\* kann auch über M auf einem Träger immobilisiert werden. Beispielsweise kann M eine Carboxyalkyleinheit, eine Aminoalkyleinheit oder eine Thioalkyleinheit sein. Die Carboxyleinheit des Komplexes (worin M für eine Carboxyalkyleinheit steht) kann durch ein wasserlösliches Carbodiimid aktiviert und an einen Nucleophile enthaltenden Träger gekoppelt werden. In ähnlicher Weise kann der amino-haltige Komplex (worin M für ein Aminoalkyl steht) kovalent an elektrophile chemische funktionelle Gruppen enthaltenden Trägern, beispielsweise einem Isothiocyanat, Isocyanat, Acylhalogenid, Sulfonylhalogenid, Acylimidazolid, Acyl-N-hydroxysuccinimid, Alkylhalogenid und einem aktiven Ester enthaltenden Trägern, immobilisiert werden. Der Thiol enthaltende Komplex (worin M für eine Thioalkyleinheit steht) kann durch Reaktion mit den oben beschriebenen chemischen reaktiven Trägern oder durch Leiten desselben über einen im Handel erhältlichen Quecksilber enthaltenden Träger, wie er bereits für Thiol enthaltende Oligonucleotide beschrieben wurde (B. Blanks et al., Nucl. Acids. Res. 16:10283-10299 (1988)), immobilisiert werden.

Ein Vorteil einer Immobilisierung eines die Triphenylmethyl-Schutzgruppe/verbindende Gruppe P-L enthaltenden Komplexes an einen Träger besteht darin, daß Produkte an dem Träger selektiv adsorbiert und nachfolgend von der Schutzgruppe abgespalten werden können. Nach Adsorption des Komplexes können alle nicht gebundenen Verunreinigungen von dem Träger gewegewaschen werden. Die Verbindung C\* kann anschließend von

dem Träger in reiner Form unter Bedingungen, bei denen der Komplex M-L-P auf dem Träger in einem adsorbierten Zustand immobilisiert verbleibt, entfernt werden.

- 5 In einer bevorzugten Ausführungsform ist M ein an die Triphenylmethyl-Schutzgruppe/verbindende Gruppe P-L über ein Abstandsmolekül, beispielsweise eine Alkylkette, gebundenes Biotin. Eine Bindung von Biotin an M des geschützten Oligonucleotids kann nach einer teilweisen Entschützung und Ab-
- 10 spaltung von dem festen Träger erfolgen. Es ist jedoch bevorzugt, die Biotinylierung durchzuführen, während das Oligonucleotid an den Träger gebunden ist. Der erhaltene biotinylierte Komplex kann in wirksamer Weise an einem in Handel erhältlichen Avidin- oder Streptavidinträger gemäß einer
- 15 früheren Beschreibung (J.M. Coull et al., Tett. Lett. 27:3991-3994 (1986)) immobilisiert werden.

- In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung können zwei oder mehrere interessierende Verbindungen gleichzeitig
- 20 aus einem zwei oder mehrere interessierende Verbindungen und Verunreinigungen umfassenden Gemisch und voneinander getrennt, und gereinigt werden. Dieses Reinigungsverfahren wird im folgenden als Mehrfachreinigung bezeichnet. Gemäß dem
- 25 Verfahren können Verbindungen der allgemeinen Formel L-P-C\* gemäß der obigen Beschreibung hergestellt werden. Zur Veranschaulichung kann C\* als ein vollständig geschütztes Oligonucleotid A (L-P-A) und ein vollständig geschütztes Oligonucleotid B (L-P-B) definiert werden. Vorzugsweise ist die
- 30 Schutzgruppe/verbindende Gruppe P-L ein Triphenylmethylderivat der allgemeinen Formel IIIa (das Oligonucleotid ist durch P in Form eines 5'-terminalen Tritylethers geschützt). In einem an den Träger gebundenen Zustand kann die reaktive
- 35 Stelle L der 5'-terminalen Schutzgruppe P eines jeden der vollständig geschützten Oligonucleotide L-P-A bzw. L-P-B weiter modifiziert werden. Der Einfachheit wegen sind die Modifikationen als M<sub>1</sub> bzw. M<sub>2</sub> definiert, um damit Verbindun-



gen der allgemeinen Formel  $M_1$ -L-P-A und  $M_2$ -L-P-B herzustellen.  $M_1$  und  $M_2$  sind Affinitäts- oder Reinigungshilfsmittel mit einer Affinität zu einem Träger S, beispielsweise Alkylketten unterschiedlicher Kohlenstofflängen. Vorzugsweise sollte das Affinitäts- oder Reinigungshilfsmittel  $M_2$  eine signifikant größere Affinität zum Träger S als das Affinitäts- oder Reinigungshilfsmittel  $M_1$  haben. Im optimalen Fall ist die Modifikation  $M_2$  eine deutlich längere Alkylkette als die Modifikation  $M_1$ . Darüber hinaus sollten die Komponenten des Gemisches und die Verbindungen A und B eine geringe oder im wesentlichen keine Affinität zum Träger S aufweisen.

Zur Reinigung von teilweise geschützten Oligonucleotiden bedient man sich typischerweise einer Reversed-Phase-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC). Im Prinzip tritt die Triphenylmethylgruppe der teilweise geschützten und vollständig zusammengebauten Produkte stärker mit der hydrophoben stationären Phase (im allgemeinen ein  $C_{18}$  beschichtetes Siliciumdioxid) in Wechselwirkung als die Verunreinigungen. Die Terminationssequenzen und andere Verunreinigungen eluieren folglich schneller aus der Säule, so daß das teilweise geschützte Oligonucleotidprodukt sicher abgetrennt wird und bei Eluieren aus der Säule gesammelt werden kann (vgl. L.W. McLaughlin und N. Piel, Oligonucleotide Synthesis, A Practical Approach (1984), M.J. Gait (Herausgeber) IRL Press Inc., Oxford, England, S. 199-218).

Wenn das die teilweise geschützten Oligonucleotide  $M_1$ -L-P-A und  $M_2$ -L-P-B sowie Verunreinigungen umfassende Gemisch Reversed-Phase-HPLC-Trennungsbedingungen unterworfen wird, werden die Komponenten in ihrer jeweiligen Reihenfolge eluiert und können jeweils in gereinigter Form gesammelt werden. Nach einer Abtrennung können die Schutzgruppen unter Bildung der vollständig geschützten und gereinigten Oligonucleotide A und B und der Nebenprodukte der allgemeinen Formel P-L- $M_1$  bzw. P-L- $M_2$  entfernt werden.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen können auch in Polymerase-katalysierten Verlängerungsreaktionen verwendet werden. Gemäß dem Verfahren wird ein Oligonucleotid, beispielsweise  
5 ein eine Länge von 10 bis 30 Nucleotiden aufweisendes Oligonucleotid, derart hergestellt, daß es zu einer einzelsträngigen Nucleinsäurematrize komplementär ist und folglich mit ihr hybridisiert. Nach erfolgter Hybridisierung verlängert eine DNA-Polymerase den Primer unter Verwendung der Nucleinsäure als Matrize, wobei die komplementäre Nucleinsäuresequenz hergestellt wird. Bei Polymerase-katalysierten Verlängerungsreaktionen können markierte Primer verwendet werden, vorausgesetzt, daß sie nicht an einem Hybridisieren mit einer Matrize infolge der gebundenen Markierung gehemmt werden  
10 und vorausgesetzt, daß die funktionelle Gruppe, von der aus die Verlängerungsreaktion fortschreitet, durch den Einbau der Markierung nicht unzugänglich gemacht wird. Eine bevorzugte Variation der Polymeraseverlängerungsreaktion ist die Polymerasekettenreaktion (PCR; US-A-4 683 202). Polymerase-katalysierte Primerverlängerungsreaktionen der 3'-terminalen Hydroxylgruppe können auch durchgeführt werden.

Das Produkt einer Primerverlängerungsreaktion kann im Rahmen eines beliebigen oben beschriebenen Verfahrens manipuliert  
25 werden. Wenn beispielsweise die Modifikation M eine nachweisbare Markierung ist, ist es möglich, den Komplex durch geeignete Maßnahmen, beispielsweise durch Fluoreszenz, Radiomarkierung, Chemilumineszenz oder Lumineszenz, nachzuweisen. Wenn der Komplex ein Affinitätshilfsmittel, beispielsweise Biotin, ist, ist es möglich, ihn an einem Avidin- oder Streptavidinträger zu immobilisieren. Das vollständig nicht modifizierte doppelsträngige Produkt kann in ähnlicher Weise zu jeder Zeit durch Entfernung der Schutzgruppe gebildet werden. Darüber hinaus kann ein doppelsträngiges DNA-Produkt einer Nucleinsäuresynthese unter Bildung  
30 von einzelsträngiger DNA denaturiert werden.

Die Polymerasekettenreaktion fordert zwei Primer, die zu unterschiedlichen Strängen einer Nucleinsäurematrize komplementär sind und den Bereich der zu vermehrenden Matrize flankieren. Wie bei einer beliebigen Primerverlängerungsreaktion ist das PCR-Produkt eine doppelsträngige Nucleinsäure. Als Amplifikations- bzw. Vermehrungsprimer beim PCR-Verfahren können modifizierte Oligonucleotidprimer der allgemeinen Formel M-L-P-C\* verwendet werden. Durch eine Primerverlängerung gebildete, teilweise geschützte doppelsträngige Nucleinsäuren können im Rahmen der oben beschriebenen Verfahren weiter modifiziert werden. Wenn zwei (2) markierte Oligonucleotidprimer bei der Polymerasekettenreaktion verwendet werden, enthält das doppelsträngige Produkt an den 5'-Enden der unterschiedlichen Stränge Markierungen. Dieses Produkt kann auch die hier für ein beliebiges teilweise geschütztes Oligonucleotid beschriebenen Reaktionen, einschließlich einer von bestimmten Bedingungen abhängigen Entfernung der Schutzgruppen unter Bildung einer nicht modifizierten doppelsträngigen Nucleinsäure, eingehen.

Die vorliegende Erfindung wird des weiteren anhand der folgenden nicht begrenzenden Beispiele veranschaulicht.

#### Beispiel 1

##### Herstellung von 2-[4-(bis-(4-methoxyphenyl)-hydroxymethyl)-phenyl]-4,4-dimethyloxazolin

350 mmol eines in 1 l frisch destilliertem Tetrahydrofuran gelösten 2-(4-Bromphenyl)-4,4-dimethyl-1,3-oxazolins (A.I. Meyers et al., J. Amer. Chem. Soc. 92:6646-6647 (1979)) wurden mit 17,0 g (700 mmol) Magnesium versetzt. Die Lösung wurde erwärmt, bis die Reaktion begann. Anschließend wurde schonend 1 h lang erwärmt. Zu diesem Zeitpunkt wurde ein weiterer Liter Tetrahydrofuran zugegeben. Nach Zugabe von 345 mmol 4,4'-Dimethoxy-benzophenon wurde das Kupplungsreaktionsgemisch 2 h unter schwachem Refluxieren gerührt. Das

Reaktionsgemisch wurde filtriert und auf etwa 500 ml eingeeengt. Nach einem langsamen Eingießen der Lösung in einen 8% wäßrigen  $\text{KHSO}_4$  (1 l) und Diethylether (1 l) enthaltenden Kolben wurden die Schichten getrennt und die organische

5 Fraktion einmal mit  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen. Ein Trocknen über  $\text{MgSO}_4$ , Filtrieren und Eindampfen lieferte 147,2 g eines orangen Öls. Das gereinigte Produkt wurde durch Kristallisation aus Benzol oder Ethylacetat erhalten.

105,4 g (252 mmol, 73%) schwachgrüner Kristalle eines Fp. von 140-142°C

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 1,36 (s, 6H,  $-\text{CH}_3$ ); 2,82 (s, 1H, O-H); 3,79 (s, 6H,  $-\text{OCH}_3$ ); 4,09 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ); 6,80-7,17 (dd, 8H,  $\text{CH}_3\text{O-Ar-H}$ ); 7,32-7,89 (dd, 4H, Oxaz-Ar-H).

## 15 Beispiel 2

### Herstellung von 4-Carboxy-4',4"-dimethoxytriphenylhydroxymethan (Fig. 1, Verbindung Ib)

200 mmol 2-[4-(Bis-(4-methoxyphenyl)-hydroxymethyl)-phenyl]-4,4-dimethyloxazolin wurden mit 400 ml einer 80%igen wäßrigen Essigsäure versetzt, worauf die Lösung 6-7 h bei 60-70°C verrührt wurde. Nach einem Einengen des Produkts zu einem orangen Öl wurde letzteres in 500 ml 20%iger NaOH in Ethanol/Wasser (1/1 (v/v)) abermals gelöst. Diese Lösung wurde 1 h kräftig refluxiert und anschließend zu einem weißen halbfesten Stoff eingeeengt. Der Rückstand wurde in 1 l  $\text{H}_2\text{O}$  gelöst und mit 3 M HCl auf einen pH-Wert von 1,0 angesäuert. Nach einem Abfiltrieren des Feststoffs wurde letzterer in 750 ml Ethylacetat gelöst. Diese Lösung wurde zweimal mit verdünnter Säure gewaschen, über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet, filtriert und eingedampft. Dabei wurden 81,2 g eines orangen Schaums erhalten. Das kristalline Produkt wurde aus Benzol erhalten. 67,49 g (185 mmol, 93%) eines orangen kristallinen Feststoffs eines Fp. von 105-107°C

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 3,80 (s, 6H,  $\text{OCH}_3$ ); 6,80-7,20 (dd, 8H,  $\text{CH}_3\text{O-Ar-H}$ ); 7,42-8,06 (dd, 4H,  $\text{HOOC-Ar-H}$ ).

Beispiel 3Herstellung von N-Succinimidyl-4-[bis-(4-methoxyphenyl)-hydroxymethyl]-benzoat (Fig. 1, Verbindung IIb)

6 mmol Ib und 9 mmol N-Hydroxysuccinimid (NHS) in 10 ml  
 5 Ethylacetat wurden unter Rühren bei 0°C mit 7,5 mmol N,N'-  
 Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) versetzt. Das Reaktionsgemisch  
 wurde 2 h bei 0°C verrührt und anschließend mit weiteren 0,5  
 mmol DCC und 1 mmol NHS versetzt. Nach 4,5 h bei 0°C wurde  
 10 das Reaktionsgemisch filtriert und mit Ethylacetat auf ein  
 Volumen von 50 ml verdünnt. Diese Lösung wurde 4mal mit Was-  
 ser, 1mal mit 5%iger wäßriger NaHCO<sub>3</sub> und abermals mit Wasser  
 gewaschen. Nach einem Trocknen der organischen Schicht über  
 MgSO<sub>4</sub>, Filtrieren und Eindampfen erhielt man 70,0 g eines  
 gelben Schaumes. Das gereinigte Produkt wurde durch Kri-  
 15 stallisation aus Ethylacetat erhalten.

2,01 g (4,4 mmol, 73%) eines weißen Feststoffs (zwei kri-  
 stalline Formen) eines Fp. von 168-170°C oder 186-188°C  
<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ = 2,77 (s, 1H, O-H); 2,90 (s, 4H, CH<sub>2</sub>);  
 3,81 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>); 6,82-7,17 (dd, 8H, CH<sub>3</sub>O-Ar-H); 7,48-8,10  
 20 (dd, 4H, Succinimidyl-Ar-H).

Beispiel 4Herstellung von N-Succinimidyl-4-[bis-(4-methoxyphenyl)-chlormethyl]-benzoat (Fig. 1, Verbindung IIIb)

25 50 mmol IIb wurden mit 250 ml Acetylchlorid versetzt. Nach  
 3stündigem Kochen der Lösung und anschließendem Kühlen wur-  
 den 350 ml eines wasserfreien Diethylethers zugegeben und  
 das Gemisch anschließend über Nacht bei 5°C aufbewahrt. Das  
 weiße kristalline Produkt wurde durch Vakuumfiltration ge-  
 30 sammelt.

21,35 g (44,5 mmol, 89%) eines weißen kristallinen Fest-  
 stoffs eines Fp. von 203-204°C

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ = 2,91 (s, 4H, CH<sub>2</sub>), 3,82 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>);  
 6,81-7,17 (dd, 8H, CH<sub>3</sub>O-Ar-H); 7,42-8,10 (dd, 4H, Succin-  
 35 imidyl-Ar-H).

Beispiel 5

Zur Herstellung von N-Succinimidyl-4-[bis-(4-methoxyphenyl)-5'-O-(2'-desoxynucleosidyl)-methyl]-benzoaten (Fig. 1, Verbindungen IV<sub>1-4</sub>) verwendetes allgemeines Vorgehen

5 7 mmol eines geeignet geschützten 2'-Desoxynucleosids, das durch Coverdampfung aus Pyridin getrocknet worden war, wurden tropfenweise mit einer 8 mmol IIIb, das in 25 ml Pyridin gelöst war, enthaltenden Lösung versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde bis zur vollständigen Reaktion (3-12 h) verrührt und anschließend durch Zugabe von 1 ml Methanol abgeschreckt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde der Rückstand zwischen 50 ml Ethylacetat und 50 ml einer 5%igen NaHCO<sub>3</sub> verteilt. Die organische Schicht wurde mit einem weiteren Teil 5%iger wäßriger NaHCO<sub>3</sub> und 1mal mit Wasser gewaschen, anschließend über MgSO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und eingedampft. Das Endprodukt wurde durch Kristallisation aus dem beschriebenen Lösungsmittel erhalten.

IVb<sub>1</sub>: 4,34 g (6,3 mmol, 90%) weiße Kristalle (Benzol)

1H-NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 1,58 (d, 3H, CH<sub>3</sub>); 2,20-2,47 (m, 2H, H2', H2"); 2,64 (s, 1H, O-H); 2,88 (s, 4H, CH<sub>2</sub>); 3,30-3,45 (m, 2H, H5', H5"); 3,79 (d, 6H, OCH<sub>3</sub>); 4,04-4,09 (m, 1H, H4'); 4,52 (m, 1H, H3'); 6,36 (dd, 1H, H1'); 6,83-6,87 (dd, 4H, Ar-H); 7,23-7,30 (dd, 4H, Ar-H); 7,44 (d, 1H, H6); 7,58-7,62 (d, 2H, Ar-H); 8,04-8,08 (d, 2H, Ar-H); 8,87 (s, 1H, N-H)

IVb<sub>2</sub>: 3,08 g (3,9 mmol, 55%) opaker Feststoff (Toluol)

1H-NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 2,51-2,63 (m, 1H, H2'); 2,85 (s, 4H, CH<sub>2</sub>); 2,89-3,03 (m, 1H, H2"); 3,32-3,47 (m, 2H, H5', H5"); 3,78 (d, 6H, OCH<sub>3</sub>); 4,17-4,23 (m, 1H, H4'); 4,69-4,76 (m, 1H, H3'); 6,44-6,50 (t, 1H, H1'); 6,78-6,86 (m, 4H, Ar-H); 7,12-7,29 (m, 5H, Ar-H); 7,48-7,60 (m, 4H, Ar-H); 7,94-8,06 (m, 4H, Ar-H); 8,14 (s, 1H, H8); 8,70 (s, 1H, H2); 9,15 (s, 1H, N-H)

IVb<sub>3</sub>: 3,34 g (4,3 mmol, 62%) opaker Feststoff (Toluol)

1H-NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 2,19-2,32 (m, 1H, H2'); 2,67-2,79 (m, 1H, H2"); 2,87 (s, 4H, CH<sub>2</sub>); 3,42-3,52 (m, 2H, H5', H5"),

3,81 (d, 6H, OCH<sub>3</sub>); 4,15-4,19 (m, 1H, H4'); 4,47-4,55 (m, 1H, H3'); 6,23-6,29 (t, 1H, H1'); 6,86-6,92 (m, 4H, Ar-H); 7,19-7,32 (m, 5H, Ar-H); 7,50-7,62 (m, 5H, Ar-H); 7,86-7,90 (m, 2H, Ar-H); 8,04-8,09 (m, 2H, Ar-H); 8,18 (d, 1H, H6);  
 5 IVb<sub>4</sub>: 4,16 g (5,3 mmol, 76%) weiße Kristalle (Ethylacetat)  
 1H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 1,12 (d, 6H, CH<sub>3</sub>); 2,30-2,42 (m, 1H, H2'); 2,70-2,84 (m, 2H, CH, H2''); 2,88 (s, 4H, CH<sub>2</sub>); 3,10-3,27 (m, 2H, H5', H5''); 3,72 (d, 6H, OCH<sub>3</sub>); 3,96 (m, 1H, H4'); 4,42 (m, 1H, H3'); 5,36 (d, 1H, O-H); 6,27 (t, 1H, H1'); 6,76-6,87 (dd, 4H, Ar-H); 7,18-7,23 (dd, 4H, Ar-H); 7,60 (d, 2H, Ar-H); 7,97 (d, 2H, Ar-H); 68,15 (s, 1H, H8).

#### Beispiel 6

15 Allgemeines Vorgehen zur Herstellung von N-Succinimidyl-4-[bis-4-(methoxyphenyl)-5'-O-(3'-O-(N,N-diisopropylamino-2-cyanoethylphosphinyl)-2'-desoxynucleosidyl)-methyl]-benzoaten (Fig. 1, Verbindungen Vb<sub>1-4</sub>)

3 mmol des in geeigneter Weise geschützten Monomers IV<sub>1-4</sub>, die in 15 ml Tetrahydrofuran gelöst waren, wurden mit 12  
 20 mmol Diisopropylethylamin und 3,3 mmol 2-Cyanoethyldiisopropylaminochlorphosphin versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde bei Umgebungstemperatur 1-2 h verrührt, filtriert und eingeeengt. Der Rückstand wurde in 100 ml Ethylacetat gelöst, 3mal mit 10%iger wäßriger Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und eingedampft. Das Produkt wurde in 15  
 25 ml Ethylacetat gelöst und in 250 ml Hexan eingetropft. Der Niederschlag wurde gesammelt und getrocknet.

Vb<sub>1</sub>: 2,10 g (2,4 mmol, 79%)

30 <sup>31</sup>P-NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ = 145,550, 145,630 ppm

Vb<sub>2</sub>: 2,53 g (2,5 mmol, 84%)

<sup>31</sup>P-NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ = 145,494, 145,677 ppm

Vb<sub>3</sub>: 1,93 g (2,0 mmol, 66%)

<sup>31</sup>P-NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ = 145,604, 145,820 ppm

35 Vb<sub>4</sub>: 2,46 g (2,5 mmol, 84%)

<sup>31</sup>P-NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ = 144,478, 145,519 ppm

Beispiel 7Oligonucleotidsynthese

Aus im Handel erhältlichen 2-Cyanoethylphosphoramiditen wur-  
 den entweder manuell (Beispiel 7a) oder mit Hilfe einer au-  
 tomatischen Synthesevorrichtung Oligonucleotide zusammenge-  
 baut. In Beispiel 7b wurde eine einen Prototyp darstellende,  
 in großem Maßstab arbeitende DNA-Synthesevorrichtung im 30  
 $\mu\text{mol}$ -Maßstab verwendet, während in Beispiel 9 eine Milli-  
 gen/Biosearch DNA-Synthesevorrichtung Modell 7500, bei der  
 ein Standard-1 $\mu\text{mol}$ -Protokoll ablief, verwendet wurde. In al-  
 len Fällen wurde die Endkondensation mit dem geeigneten mo-  
 difizierten tritylgeschützten 2-Cyanoethylphosphoramidit  
 (Vb<sub>1-4</sub>) unter Bildung der vollständig geschützten, an einen  
 Träger gebundenen Oligonucleotide mit einer 5'-terminalen,  
 verbindenden NHS-Estergruppe (L) durchgeführt. Die Harze  
 (oder Teile der Harze) wurden mit Aminogruppen enthaltenden  
 Verbindungen zur Funktionalisierung der 5'-terminalen, ver-  
 bindenden NHS-Estergruppe (L) gemäß Beispiel 8 behandelt.  
 Eine weitere Verlängerung oder Markierung kann im Rahmen des  
 in Beispiel 9 beschriebenen Verfahrens an an Harzen gebunde-  
 nen, vollständig geschützten, 5'-funktionelle Gruppen ent-  
 haltenden Oligonucleotiden durchgeführt oder die Oligonu-  
 cleotid können vom Träger entfernt, teilweise entschützt und  
 in Lösung entsprechend Beispiel 11 umgesetzt werden.

Beispiel 7aHerstellung eines Thymidindimers im 15  $\mu\text{mol}$ -Maßstab

Ein im Handel erhältliches 15  $\mu\text{mol}$  DMT-Thymidin-Succinyl-AP-  
 CPG-Harz (Milligen/Biosearch, Division of Millipore, Bur-  
 lington, Ma.) wurde mit 3% Dichloressigsäure in Dichlorme-  
 than detrityliert, bis der Ausfluß farblos war. Das Harz  
 wurde mit 5 ml Acetonitril gewaschen und unter Hochvakuum  
 getrocknet. Nach abermaligem Waschen des Harzes mit 5 ml



trockenem Acetonitril wurden 950  $\mu$ l eines 0,085 M Thymidin-phosphoramidits (Vb<sub>1</sub> in Fig. 1) in trockenem Acetonitril und 2 ml einer im Handel erhältlichen Tetrazolaktivierungslösung vermischt und das Gemisch langsam im Verlauf von 4 min durch das Harz gepreßt. Das Harz wurde mit 5 ml Acetonitril gewaschen, worauf 6 ml einer im Handel erhältlichen I<sub>2</sub>-Oxidationslösung im Verlauf von 2 min durch die Säule gepreßt wurden. Schließlich wurde das Harz mit 5 ml Acetonitril gewaschen und unter Hochvakuum getrocknet. Teile des Harzes wurden mit Aminogruppen enthaltenden Verbindungen zur Funktionalisierung der 5'-terminalen verbindenden NHS-Estergruppe (L) gemäß Beispiel 8 behandelt. Die 5'-modifizierten Oligonucleotide wurden anschließend teilweise entschützt und von dem Träger gemäß Beispiel 10 entfernt. Tabelle 1 faßt die verschiedenen mit L umgesetzten Verbindungen und die Produktausbeute des rohen 5'-modifizierten Thymidindimers gemäß HPLC-Analyse zusammen.

Tabelle 1

Zur Modifizierung der 5'-terminalen verbindenden NHS-Estergruppe (L) des Thymidindimers verwendete, Aminogruppen enthaltende Verbindungen

| 25 | Amin                   | Retentionszeit* | Fläche (%) |
|----|------------------------|-----------------|------------|
|    | Cyclohexylamin         | 40,37           | 99+        |
|    | 1-Aminohexan           | 43,02           | 99+        |
|    | 1,3-Diaminopropan      | 29,15           | 78,5       |
| 30 | 1,4-Diaminobutan       | 29,60           | 73,3       |
|    | 1,6-Diaminohexan       | 31,24           | 73,0       |
|    | 1,8-Diaminooctan       | 33,88           | 70,3       |
|    | 1,12-Diaminododecan    | 40,78           | 71,0       |
|    | 3-Amino-1,2-propandiol | 29,85           | 99+        |
| 35 | 2-Amino-1,3-propandiol | 27,81           | 72,0       |
|    | 6-Aminohexanol         | 34,43           | 99+        |
|    | 6-Aminocaprinsäure     | 30,83           | 91,9       |

\*Reversed-Phase-HPLC-Analyse: Delta Pak C18-100Å Flüssigchromatographiesäule (Waters, Division of Millipore)

Puffer A = 100 mmol Triethylammoniumacetat eines pH-Werts von 6,8

Puffer B = Acetonitril/Wasser 95/5

Gradient: 0 min (5% B); 50 min (60% B); Strömungsgeschwindigkeit = 1,0 ml/min; Temperatur 40°C

#### 10 Beispiel 7b

Herstellung von 5'-TCCCAGTCACGACGT -3' im 30 µmol-Maßstab

Eine 30 µmol-Synthese von 5'-TCCCAGTCACGACGT -3' wurde unter Verwendung einer einen Prototyp darstellenden, in einem großen Maßstab arbeitenden DNA-Synthesevorrichtung, bei der das in Tabelle 2 beschriebene Protokoll ablief, durchgeführt. Die Endkondensationsreaktion erfolgte unter Verwendung einer Verbindung Vb<sub>1</sub> zur Einführung der reaktiven, verbindenden NHS-Estergruppe (L) in den 5'-Terminus des an einen Träger gebundenen Oligonucleotids.

20 Am Ende der Synthese wurde ein Teil des Harzes gemäß Beispiel 8 mit 1,6-Diaminohexan behandelt. Das aminofunktionalisierte Oligonucleotid wurde von dem Harz entfernt und gemäß Beispiel 10 teilweise entschützt. Die in der Lösung ablaufende Reaktion der 5'-terminalen Aminogruppe mit N-Hydroxysuccinimidyl-biotin ist in Beispiel 11 beschrieben.

30 Der Rest des Harzes wurde gemäß Beispiel 8 mit verschiedenen Alkylaminen behandelt. Die teilweise geschützten 5'-modifizierten Oligonucleotide wurden durch Behandeln der Harze gemäß Beispiel 10 erhalten und zur Demonstration einer Mehrfachreinigung in Beispiel 13 verwendet.

Tabelle 2

In großem Maßstab durchgeführtes DNA-Syntheseprotokoll

|    | Funktion                     | Infusionsrate (ml (min)) | Dauer (s) |
|----|------------------------------|--------------------------|-----------|
| 5  | Waschen mit DCA              | 7000                     | 240       |
|    | Waschen mit ACN              | 7000                     | 120       |
|    | Waschen mit TEA              | 7000                     | 60        |
|    | Waschen mit ACN              | 7000                     | 300       |
| 10 | Kondensation                 | N/A*                     | 300       |
|    | Waschen mit ACN              | 7000                     | 240       |
|    | Oxidation mit I <sub>2</sub> | 7000                     | 30        |
|    | Waschen mit ACN              | 7000                     | 180       |

15 \*Für jede Kondensationsreaktion wird ein 10facher Überschuß  
 2-Cyanoethylphosphoramidit in genügend 2,5%igem 1H-Tetrazol  
 in Acetonitril (g/v) zur Herstellung einer 200 mmol Lösung  
 gelöst. Das aktivierte Amidit wird aufgegeben und während  
 der angegebenen Zeitdauer durch die Säule zirkulieren gelas-  
 20 sen.

Beispiel 8

Aminolyse des N-Hydroxysuccinimidylesters (verbindende Grup-  
 pe L) mit Alkylaminen, Alkyldiaminen, Hydroxyalkylaminen  
 25 oder Carboxyalkylaminen

Nach dem in der festen Phase erfolgenden chemischen Zu-  
 sammenbau eines Oligonucleotids wurde der Träger zur Ent-  
 fernung jeglichen verbliebenen Lösungsmittels evakuiert. Ty-  
 pischerweise wurden 2 ml einer 0,5-1,0 M Lösung einer Amino-  
 30 gruppen enthaltenden Verbindung in 75%igem wäßrigen Dioxan  
 während 2 min durch das Harz gepreßt. Nicht in 75%igem wäß-  
 rigem Dioxan lösliche Verbindungen wurden gemäß der Be-  
 schreibung in Tabelle 3 gelöst. Der Träger wurde anschlie-  
 ßend mit 2 ml Tetrahydrofuran und 2 ml Acetonitril gewa-  
 35 schen. Danach wurde das Harz im Vakuum getrocknet und mit  
 Ammoniak gemäß der Beschreibung in Beispiel 10 behandelt

oder des weiteren gemäß der Beschreibung in Beispiel 9 umgesetzt. Eine Reversed-Phase-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)-Analyse wurde durchgeführt, um die Reinheit aller rohen, teilweise geschützten Produkte zu bestimmen.

5 Alle analytischen Trennungen wurden mit einer 3,8 mm x 150 mm Delta Pak C18-100Å-Chromatographiesäule durchgeführt.

Tabelle 3

Variationen bei den zur Derivatisierung von NHS-Estern verwendeten Bedingungen

10

| Amin                 | Lösungsmittel         | Konzentration |
|----------------------|-----------------------|---------------|
| 1-Aminododecan       | THF*                  | 1,0 M         |
| 15 1-Aminopentadecan | THF                   | 0,5 M         |
| 1-Aminooctadecan     | THF                   | 0,4 M         |
| 1,8-Diaminooctan     | 9/1 THF/Wasser        | 1,0 M         |
| 1,12-Diaminododecan  | 95/5 Dioxan/Wasser    | 0,5 M         |
| 6-Aminocaprinsäure   | 1/2 Dioxan/5% wäßrige |               |
| 20                   | NaHCO <sub>3</sub>    | 0,5 M         |

\*THF ist eine Abkürzung für Tetrahydrofuran

### Beispiel 9

25

In einem an einen Träger gebundenen Zustand durchgeführte Synthese von mit Biotin und Fluorescein markierten PCR-Primern

30

Zwei zu den gegenüberliegenden Strängen einer Bakteriophagen Lambda-DNA komplementäre Oligonucleotide wurden gemäß Beispiel 7 chemisch zusammengebaut. Die hergestellten Sequenzen waren 5'-GATGAGTTCGTGTCCGTACAACCTGG-3' und 5'-GGTTATCGAAATCA-GCCACAGCGCC-3'. Diese Oligonucleotide dienten als Primer für die Vermehrung eines 500 bp-Segments von Lambda-DNA unter Verwendung der Polymerasekettenreaktion (PCR) (Beispiel 15) und werden im folgenden als PCR-Primer 1 bzw. PCR-Primer 2 bezeichnet.

35

Nach Beendigung der 1  $\mu$ mol-Synthese eines jeden Primers wurde der 5'-terminale NHS-Ester der an das Harz gebundenen, geschützten Oligonucleotide mit 1,12-Diaminododecan gemäß der Beschreibung in Beispiel 8 umgesetzt. Beide Harze wurden anschließend in drei ungleiche Teile gespalten.

Eine Hälfte des Harzes aus jeder Synthese wurde unter Hochvakuum getrocknet und mit Ammoniak gemäß Beispiel 10 behandelt. Beide Rohproben wurden gemäß dem in Beispiel 12 beschriebenen Verfahren gereinigt, worauf ein Teil einer jeden gereinigten Probe gemäß dem in Beispiel 14 beschriebenen Verfahren detrityliert wurde. Dadurch wurden sowohl vollständig entschutzte als auch gereinigte PCR-Primer (im folgenden als Vergleichs-PCR-Primer 1 bzw. 2 bezeichnet), die für Beispiel 17 erforderlich sind, hergestellt. Jede Probe erwies sich gemäß Reversed-Phase-HPLC-Analyse als rein.

Auf ein Viertel des verbliebenen Harzes aus jeder Primersynthese wurde während einer Dauer von 30 min 1 ml einer 0,25 M-Lösung von N-Hydroxysuccinimidyl-biotin, das in Dimethylformamid/Diisopropylethylamin/Wasser in einem Verhältnis 7/2/1 (v/v/v) gelöst war, einwirken gelassen. In ähnlicher Weise wurde auf das verbleibende eine Viertel des Harzes aus jeder Primersynthese während einer Dauer von 60 min 1 ml einer 0,125 M-Lösung von Di-O-pivaloyl-5-(N-succinimidyl)-fluorescein, das in Dioxan/Diisopropylethylamin/Wasser in einem Verhältnis von 7/2/1 (v/v/v) gelöst war, einwirken gelassen. Nach Beendigung der Markierungsreaktionen wurde der Träger mit 2 ml Dimethylformamid, 2 ml Tetrahydrofuran und 2 ml Acetonitril gewaschen und schließlich unter Hochvakuum getrocknet. Teilweise geschützte markierte Oligonucleotide wurden durch Behandlung der Harze, die die vollständig geschützten und markierten Oligonucleotide enthielten, gemäß Beispiel 10 erhalten.

Fig. 2 ist die HPLC-Analyse des rohen, teilweise geschütz-  
 ten, mit Fluorescein markierten PCR-Primers 1. Sowohl die UV-  
 Absorption bei 260 nm als auch die Fluoreszenz (Einsatz) bei  
 470 nm (Erregungswellenlänge 410 nm) wurden aufgezeichnet.  
 Die Analyse zeigt, daß die bei 34,4 min eluierende Hauptkom-  
 ponente das alleinige fluoreszierende Produkt ist. Die Roh-  
 probe wurde gemäß dem in Beispiel 12 beschriebenen Verfahren  
 gereinigt und wird im folgenden Fluor-PCR-Primer 1 bezeich-  
 net. Eine HPLC-Analyse der Rohprobe des mit Fluorescein mar-  
 kierten PCR-Primers 2 (im folgenden als Fluor-PCR-Primer 2  
 bezeichnet) ähnelte derjenigen, die bei dem Fluor-PCR-Primer  
 1 beobachtet wurde. Er wurde in ähnlicher Weise durch Re-  
 versed-Phase-HPLC gereinigt.

Die Reversed-Phase-HPLC-Analyse der rohen, mit Biotin mar-  
 kierten Vergleichs-PCR-Primers (im folgenden als Bio-PCR-  
 Primer 1 bzw. 2 bezeichnet) war ebenfalls sehr ähnlich. Die  
 Hauptkomponente einer jeden Probe wurde nach dem in Beispiel  
 12 beschriebenen Verfahren isoliert. Die Anwesenheit von  
 Biotin in den Oligonucleotiden wurde durch Binden der gerei-  
 nigten Produkte an einen Streptavidin-Agarose-Träger bestä-  
 tigt (J.M. Coull et al., Tett. Lett. 27: 3991-3994 (1986)).  
 Der Bio-PCR-Primer 1 und der Bio-PCR-Primer 2 wurden in den  
 in Beispiel 17 beschriebenen Polymerasekettenreaktionen ver-  
 wendet.

Die HPLC-Bedingungen waren die folgenden:

Puffer A = 100 mmol Triethylammoniumacetat eines pH-Wert von  
 6,8;  
 Puffer B = Acetonitril/Wasser in einem Verhältnis von 95/5;  
 Gradient: 0 min (5% B), 50 min (60% B); Fließgeschwindigkeit  
 = 1,0 ml/min; Temperatur: 40°C

Beispiel 10Teilweise Entschützung und Entfernung der Oligonucleotide von festen Trägern

Sobald das Oligonucleotid entsprechend den Wünschen funktio-  
 5 nalisiert/markiert war, wurde das getrocknete Harz mit 0,5  
 ml konzentriertem Ammoniak während 8-10 h bei 55°C behan-  
 delt. Das Harz wurde durch Filtration entfernt und mit Was-  
 ser gewaschen. Das Filtrat und die Waschlösungen wurden ver-  
 einigt und zur Trockene aufkonzentriert. Das Roholigonucleo-  
 10 tid wurde in 1 ml entionisiertem Wasser gelöst. Die Ausbeute  
 und Konzentration des Oligonucleotids wurden aus 10 µl der  
 auf 1,0 ml mit Wasser verdünnten Probe mit Hilfe der Absorp-  
 tion bei 260 nm bestimmt.

Beispiel 11In der Lösungsphase erfolgende Markierung von Oligonucleo-  
tiden

Markierte Oligonucleotide wurden auch durch eine in Lösungs-  
 phase erfolgende Reaktion von funktionelle Gruppen enthal-  
 20 tenden, teilweise geschützten Oligonucleotiden erhalten. Das  
 Oligonucleotid 5'-TCCCAGTCACGACGT -3' wurde gemäß Beispiel  
 7b hergestellt und 1,6-Diaminohexan zur Funktionalisierung  
 der verbindenden NHS-Estergruppe L im Rahmen des in Beispiel  
 8 beschriebenen Verfahrens behandelt. Nach Spaltung und  
 25 teilweiser Entschützung des Oligonucleotids gemäß dem in  
 Beispiel 10 beschriebenen Verfahren wurde die 5'-terminale  
 Aminogruppe des teilweise entschützten Oligonucleotids wie  
 folgt biotinyliert:

16 mg N-Hydroxysuccinimidyl-biotin, die in 500 µl Dimethyl-  
 30 formamid gelöst waren, wurden mit 250 µl 0,1 M 4-(2-Hydroxy-  
 ethyl)-1-piperazinethansulfonsäure (HEPES) eines pH-Werts  
 von 7,7 und 50 A<sub>260</sub>-Einheiten eines 5'-Aminogruppen enthal-  
 tenden, teilweise geschützten, 15 Monomereinheiten enthal-  
 35 tenden Rohpolymers in 250 µl Wasser versetzt. Nach 5 min, 55  
 min und 120 min entnommene Aliquote des Reaktionsgemisches

wurden durch Reversed-Phase-HPLC analysiert. Die Analyse zeigte ein vollständiges Verschwinden der Hauptkomponente des Rohgemisches innerhalb von 2 h zu Gunsten eines hydrophoberen Produkts. Innerhalb von 2 h wurde keine Reaktion von anderen Komponenten des Gemisches beobachtet. Dieses neue Produkt wurde durch eine im präparativen Maßstab durchgeführte Reversed-Phase-HPLC gemäß dem in Beispiel 12 beschriebenen Verfahren isoliert. Es zeigte sich, daß dieses Produkt an Streptavidinagarose bindet (J.M. Coull et al, aaO).

Die HPLC-Eluierbedingungen waren die folgenden:

Puffer A = 100 mmol Triethylammoniumacetat eines pH-Werts von 6,8;

Puffer B = Acetonitril/Wasser in einem Verhältnis von 95/5; Gradient: 0 min (5% B), 40 min (40% B); Strömungsgeschwindigkeit = 1,0 ml/min; Temperatur: 40°C

#### Beispiel 12

#### Präparative Reinigung von teilweise geschützten Oligonucleotiden

Oligonucleotide wurden durch eine im präparativen Maßstab durchgeführte HPLC gereinigt. Die Trennungen erfolgten mit Hilfe einer Delta Pak C18-300Å-Flüssigchromatographiesäule (Waters, Milford MA) einer Größe von 7,8 mm x 300 mm. Der Säulenauslauf wurde in etwa 1 ml Fraktionen in 50 µl Diisopropylethylamin und 50 µl nicht-gepuffertes 20 mmol Tris-(hydroxymethyl)aminomethan (Tris) enthaltenden Röhrchen gesammelt. Die Produktfraktionen wurden im Vakuum zur Trockene eingengt, worauf der Rückstand in sterilem Wasser gelöst und der Inhalt der Röhrchen vereinigt wurde. Das Material wurde abermals zur Trockene eingengt, worauf der Rückstand in sterilem Wasser gelöst wurde. Aliquoten der in den Polymerasekettenreaktionen zu verwendenden Proben wurden auf eine Konzentration von 20 nmol/ml eingestellt. Die Eluierbe-



dingungen für präparative HPLC-Trennungen wurden für die einzelnen Isolationen optimiert.

### Beispiel 13

#### 5 Mehrfachreinigung von teilweise geschützten Oligonucleotiden

Eine Mehrfachreinigung ist als gleichzeitige Reinigung von zwei oder mehr Verbindungen definiert. Da es möglich ist, den 5'-Terminus eines vollständig geschützten Oligonucleotids gemäß der Beschreibung in Beispiel 8 zu manipulieren, ist es auch möglich, die Affinität des erhaltenen, teilweise geschützten Oligonucleotids bezüglich eines Affinitätssträgers im voraus zu bestimmen. Die Bindung von Alkylketten an dem Triphenylmethylderivat führt zu selektiven Veränderungen der Affinität der teilweise geschützten Oligonucleotide bezüglich der hydrophoben Träger. Der im allgemeinen bei der im präparativen Maßstab durchgeführten Reversed-Phase-Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) verwendete Träger ist ein C18-beschichtetes Siliciumdioxid, gegenüber dem Oligonucleotide eine geringe Affinität aufweisen.

20

Die Wirkung der Alkylkettenlänge auf die Retention teilweise geschützter Oligonucleotide wird gezeigt. In diesem Beispiel wurden Teile des die vollständig geschützte Sequenz 5'-TCC-CAGTCACGACGT -3' (aus Beispiel 7b) enthaltenden Harzes nach dem in Beispiel 8 beschriebenen Verfahren mit sieben verschiedenen Alkylaminen der allgemeinen Formel  $H_2N(CH_2)_nCH_3$  mit  $n = 2, 5, 7, 9, 11, 14$  oder  $17$  behandelt. Die Harzaliquote wurden vermischt und mit Ammoniak gemäß der Beschreibung in Beispiel 10 behandelt. Fig. 3 ist die Reversed-Phase-HPLC-Analyse der Komponenten des Rohgemisches. Jedes der sieben teilweise geschützten Oligonucleotide wurde von den anderen innerhalb einiger Minuten, bezogen auf die Grundlinie, getrennt, wobei die Produkte in der Reihenfolge zunehmender Alkylkettenlänge eluierten. Die Identität der Peaks wurde durch Koeluieren mit unabhängig isolierten authentischen Proben bestätigt.

35

Die verwendeten HPLC-Bedingungen waren die folgenden:

Puffer A = 100 mmol Triethylammoniumacetat eines pH-Werts von 6,8;

5 Puffer B = Acetonitril/Wasser in einem Verhältnis von 95/5;  
Gradient: 0 min (10% B), 5 min (20% B), 50 min (55% B), 60 min (60% B), 65 min (60% B); Strömungsgeschwindigkeit = 1,0 ml/min; Temperatur: 40°C

10 In einem weiteren Beispiel einer Mehrfachreinigung wurden zwei teilweise geschützte Oligonucleotide unterschiedlicher Länge und Sequenz gleichzeitig gereinigt. Dies erfolgte durch Derivatisierung der verbindenden NHS-Estergruppe (L) zweier vollständig geschützter Oligonucleotide mit Alkylket-

15 ten unterschiedlicher Länge entsprechend dem in Beispiel 8 beschriebenen Vorgehen. Ein 30 Monomereinheiten aufweisendes Polymer der Nucleotidsequenz 5'-AATTCATAAGGTAATTCAAAA-TGTTTGTCA-3' wurde mit 1-Aminodecan behandelt. Ein 24 Monomereinheiten aufweisendes Polymer der Nucleotidsequenz 5'-

20 ACTCCCGGCCCCCGGGCCTCCACC -3' wurde mit 1-Aminohexan behandelt. Es erfolgte eine im analytischen Maßstab durchgeführte HPLC der gemäß Beispiel 10 erhaltenen rohen, teilweise geschützten Produkte. Die Hauptkomponente des mit 1-Aminodecan derivatisierten, 30 Monomereinheiten aufweisenden Polymers

25 eluierte bei 33,8 min und umfaßte 60,6% der Probe gemäß Bestimmung durch Integration der Peakflächen. Die Hauptkomponente des mit 1-Aminohexan derivatisierten, 24 Monomereinheiten aufweisenden Polymers eluierte bei 24,0 min und umfaßte 58,8% der Probe gemäß Bestimmung durch Integration der

30 Peakflächen. Diese beiden Hauptprodukte mit signifikant unterschiedlichen Retentionszeiten wurden in einer gleichzeitigen, im präparativen Maßstab durchgeführten Reinigung gemäß Beispiel 12 hinsichtlich der Grundlinie getrennt. Eine Entfernung der 5'-terminalen modifizierten Schutzgruppe ge-

35 mäß Beispiel 14 lieferte die gereinigten, vollständig geschützten Oligonucleotide, deren Identität durch Koeluierten

mit unabhängig isolierten authentischen Proben bestätigt wurde.

Die analytischen HPLC-Eluierbedingungen waren die folgenden:

5 Puffer A = 100 mmol Triethylammoniumacetat eines pH-Werts von 6,8;

Puffer B = Acetonitril/Wasser in einem Verhältnis von 95/5;  
Gradient: 0 min (10% B), 5 min (20% B), 50 min (55% B), 60  
min (60% B), 65 min (60% B); Strömungsgeschwindigkeit = 1,0  
10 ml/min; Temperatur: 40°C

Die präparativen HPLC-Eluierbedingungen waren die folgenden:

Puffer A = 100 mmol Triethylammoniumacetat eines pH-Werts von 6,8;

15 Puffer B = Acetonitril/Wasser in einem Verhältnis von 95/5;  
Gradient: 0 min (10% B), 5 min (20% B), 50 min (55% B);  
Strömungsgeschwindigkeit = 3,0 ml/min; Temperatur: 60°C

#### Beispiel 14

#### 20 Vollständige Entschützung von teilweise geschützten Oligonucleotiden

War die vollständige Entschützung von modifizierten tritylhaltigen Oligonucleotiden gewünscht, wurden die Proben zur Trockene eingedampft und in 100 µl einer 80%igen wäßrigen  
25 Essigsäure gelöst. Nach 2 h bei 0°C wurden die Proben zur Trockene eingedampft und in einem bekannten Volumen Wasser gelöst.

Dieses Vorgehen erfolgte mit einer Hälfte einer jeden der in  
30 Beispiel 9 beschriebenen, Amingruppen enthaltenden Vergleichs-PCR-Primersequenzen. Dies führte zu vollständig entschützten, nicht modifizierten (natürlichen) Primern für die in Beispiel 17 beschriebenen Polymerasekettenreaktionen.

35 Eine vollständige Entfernung der 5'-terminalen modifizierten Tritylgruppe durch die wäßrige Säure wurde durch Reversed-

Phase-HPLC untersucht. Eine Analyse des in Beispiel 9 beschriebenen, gereinigten, teilweise geschützten, mit 1,12-Diaminododecan modifizierten PCR-Primers 1 zeigte eine einzelne Verbindung, die bei 30,7 min eluierte. Nach einer Säurebehandlung verblieb kein Ausgangsmaterial und es wurde ein dem vollständig entschützten Oligonucleotid entsprechender einzelner Peak beobachtet, der bei 15,5 min eluierte.

Die HPLC-Analysebedingungen waren die folgenden:

Puffer A = 100 mmol Triethylammoniumacetat eines pH-Werts von 6,8;  
 Puffer B = Acetonitril/Wasser in einem Verhältnis von 95/5;  
 Gradient: 0 min (5% B), 50 min (60% B); Strömungsgeschwindigkeit = 1,0 ml/min; Temperatur: 40°C

#### Beispiel 15

##### Für PCR-Reaktionen verwendete Bedingungen

Die Polymerasekettenreaktionen (PCR) umfaßten 200 µl 50 mmol KCl, 10 mmol Puffer (Tris, pH-Wert 8,3 oder N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-hydroxypropansulfonsäure (Heppso), pH-Wert 8,7 wie angegeben), 1,5 mmol MgCl<sub>2</sub> und 200 mmol jeweils dNTP mit 10 Einheiten Amplitaq™ DNA-Polymerase, 200 pmol eines jeden Primers und 2 bis 20 fmol Bakteriophagen Lambda DNA-Matrize. Zur Vervollständigung von insgesamt 30 Vermehrungszyklen pro Probe bediente man sich jeweils zweier unterschiedlicher Vermehrungszyklusprotokolle für 15 Wiederholungen. Der Zyklus für die ersten 15 Wiederholungen bestand aus 15 s bei 96°C, 15 s bei 65°C und 30 s bei 72°C + 2 s pro Zyklus Verlängerung. Der Zyklus für die zweiten 15 Wiederholungen bestand aus 15 s bei 96°C, 15 s bei 55°C und 60 s bei 72°C + 2 s pro Zyklus Verlängerung.

#### Beispiel 16

##### Herstellung von Streptavidinagarose

Streptavidinagarose (Gibco BRL, Bethesda MD) wurde vor Verwendung behandelt. Die Agarose wurde dreimal mit 200 µl 150

mmol NaCl, 10 mmol NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> eines pH-Werts von 7,2 mit 0,05% NaN<sub>3</sub> und 10% Acetonitril gewaschen. Das Harz wurde anschließend mit einem 25 µl Aliquot 0,5 M NaCl in 80%iger wäßriger Essigsäure, die 0,5% (g/v) Aminoethanthiolhydrochlorid enthielt, gewaschen, worauf 100 µl dieser Lösung mit der Streptavidinagarose während 1 h reagieren gelassen wurde. Das Harz wurde abermals dreimal mit 100 µl 150 mmol NaCl, 10 mmol NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> eines pH-Werts von 7,2, das 0,05% NaN<sub>3</sub> enthielt und 10% Acetonitril gewaschen.

### Beispiel 17

#### Affinitätsreinigung und Isolierung von PCR-vermehrten Nucleinsäuren

Die Verwendung von 5'-modifizierten Oligonucleotiden zur Reinigung von Polymerasekettenreaktionsprodukten wurde demonstriert. Ein 500 Basepaare umfassendes Segment einer Bakteriophagen Lambda-DNA wurde unter Verwendung verschiedener Kombinationen von biotinylierten oder natürlichen (nicht modifizierten) Primern vermehrt. Es wurde gezeigt, daß die Vermehrungsprodukte der Reaktionen mit den biotinylierten Primern durch den Streptavidinagaroseträger selektiv festgehalten wurden. Ein Einwirkenlassen von Bedingungen, von denen bekannt ist, daß die 5'-biotinylierte Tritylgruppe von der DNA abgespalten wird, auf die Träger führte zu einer Gewinnung des 500 Basepaare umfassenden Fragments in seiner nicht modifizierten Form.

PCR-Reaktionen wurden gemäß der Beschreibung in Beispiel 15 unter Verwendung der Vergleichs-PCR-Primer 1 und 2 und Bio-PCR-Primer 1 und 2 aus Beispiel 9 durchgeführt. Tabelle 4 beschreibt die verschiedenen Kombinationen aus Primern und Bedingungen, die für die einzelnen Reaktionen verwendet wurden.

Tabelle 4

Für die PCR-Reaktion verwendete Primer und Bedingungen

| Reaktion | Primer   | Puffer | Polymerase |
|----------|--|--------|------------|
| 5        |  |        |            |
| 1        | Vergleichs-PCR-Primer 1<br>Vergleichs-PCR-Primer 2   | Tris   | -          |
| 2        | Vergleichs-PCR-Primer 1<br>Vergleichs-PCR-Primer 2   | Heppso | -          |
| 10       | 3 Vergleichs-PCR-Primer 1<br>Vergleichs-PCR-Primer 2 | Tris   | +          |
| 4        | Vergleichs-PCR-Primer 1<br>Vergleichs-PCR-Primer 2   | Heppso | +          |
| 15       | 5 Bio-PCR-Primer 1<br>Vergleichs-PCR-Primer 2        | Heppso | +          |
| 6        | Vergleichs-PCR-Primer 1<br>Bio-PCR-Primer 2          | Heppso | +          |
| 7        | Bio-PCR-Primer 1<br>Bio-PCR-Primer 2                 | Heppso | +          |

20

Nach der Vermehrung wurde ein Teil einer jeden PCR-Reaktion (50  $\mu$ l mit vorbehandelter (vgl. Beispiel 16) Streptavidinagarose (100  $\mu$ l) 30 min inkubiert. Am Ende der Inkubation wurde der Überstand entfernt und die Streptavidinagarose zweimal mit 100  $\mu$ l 150 mmol NaCl, 10 mmol  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  eines pH-Werts von 7,2, das 0,05%  $\text{NaN}_3$  enthielt, und 10% Acetonitril (im folgenden als Streptavidinpuffer bezeichnet) gewaschen. Die Waschlösungen wurden mit dem Überstand vereinigt. Diese Proben sind der "Trägersausfluß" und enthalten beliebiges Material, das nicht an den Streptavidinträger bindet. Die Streptavidinagarose wurde abermals zweimal mit 100  $\mu$ l Streptavidinpuffer gewaschen, worauf diese Aliquote verworfen wurden.

30

35

Das durch den Biotintrityllinker an die Streptavidinagarose gebundene Material wurde anschließend durch Einwirkenlassen von Säure auf den Träger gewonnen. Ein 25  $\mu$ l Aliquot von 0,5 M NaCl in 80%iger wäßriger Essigsäure wurde durch das Harzbett hindurchgewaschen und aufgefangen. Das Harz wurde an-

schließend 2 h mit 100  $\mu$ l 0,5 M NaCl in 80%iger wäßriger Essigsäure bei 4°C behandelt. Der Überstand wurde gewonnen und mit der ursprünglichen Säurewaschlösung vereinigt. Der Träger wurde abermals dreimal mit 100  $\mu$ l einer Lösung, die 0,25 mmol Tris eines pH-Werts von 9,0, 0,15 mmol NaCl und 0,05% Natriumazid (g/v) in Wasser/Acetonitril mit einem Verhältnis von 8/2 (v/v) enthielt, gewaschen. Die Säurefraktionen und Waschlösungen wurden vereinigt und im folgenden als "Säureausfluß"-Proben bezeichnet. Diese Proben enthielten Material, das von dem Träger durch Bedingungen, von denen bekannt ist, daß sie die Trityletherbindung spalten, entfernt werden kann.

Um zu zeigen, daß eine selektive Adsorption und Wiedergewinnung biotinylierter, durch PCR gebildeter DNA-Fragmente erreicht wurde, wurden die PCR-Reaktionen, die "Trägerausfluß"-Proben und die "Säureausfluß"-Proben durch Gelelektrophorese analysiert. Vor der Analyse wurden die "Trägerausfluß"-Proben und "Säureausfluß"-Proben zur Trockene eingedampft und in 50  $\mu$ l sterilem Wasser gelöst. Salz und überschüssiger Primer wurden durch Applizieren einer jeden Probe auf eine Sephadex G-50-Spinnsäule in der vom Hersteller beschriebenen Weise (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) entfernt. Diese Proben wurden abermals zur Trockene eingedampft und in 50  $\mu$ l sterilem Wasser gelöst. 10  $\mu$ l Aliquote wurden anschließend auf ein 2% Agarose-Elektrophoresegel appliziert und direkt mit den PCR-Reaktionsprodukten verglichen.

Fig. 4 ist eine Photographie des mit Ethidiumbromid angefärbten Elektrophoresegels, das aus der Analyse verschiedener Proben erhalten wurde.

Die Spuren A und B enthalten Aliquote der Vergleichs-PCR-Reaktionen 1 und 2, in denen alle Komponenten der Reaktionen gemäß Beschreibung in Beispiel 15 mit Ausnahme der Polymera-

se zugesetzt worden waren. Wie erwartet wird keine Vermehrung festgestellt. Die Spuren C und T enthalten einen im Handel erhältlichen DNA-Größe (size)-Marker (123 bp DNA Marker, Gibco BRL, Bethesda, MD). Spur I enthält einen weiteren  
 5 im Handel erhältlichen DNA-Größe (size)-Marker (DNA Marker V, Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN).

Die Spuren D-H enthalten jeweils die PCR-Produkte aus den Reaktionen 3-7 der Tabelle 4. In jedem Fall ist eine gut definierte Bande vorhanden, die dem 500 Basepaare umfassenden  
 10 DNA-Fragment entspricht. Dadurch wird gezeigt, daß mit den verschiedenen Kombinationen aus Puffern und nicht modifizierten oder biotinylierten Primern eine wirksame Vermehrung erfolgte.

15 Eine Materialanalyse des "Trägerausflusses" ist in den Spuren J-N dargestellt, die den Reaktionen 3-7 entsprechen. Die Anwesenheit der Banden in den Spuren J und K zeigt, daß Vermehrungsprodukte aus Reaktionen, die nicht modifizierte Primer enthalten, durch die Streptavidinagarose nicht festgehalten werden. Die Abwesenheit oder deutliche Abnahme des  
 20 Fragments in den Spuren L-N (aus den Reaktionen 5-7) zeigt, daß von den biotinylierten Tritylprimern herrührende DNA vom Träger gebunden wird.

25 Eine Wiedergewinnung gebundener, biotinylierter Fragmente wurde durch Säurebehandlung der an den Träger gebundenen DNA, wie in den Spuren O-S (aus den Reaktionen 3-7) gezeigt, erreicht. Die Spuren O und P entsprechen dem Säureausfluß,  
 30 der von den Reaktionen 3 bzw. 4 herrührt. Es ist keine DNA vorhanden, da diese Reaktionen nicht modifizierte Primer enthielten und somit keine DNA an der Streptavidinagarose gebunden war. Die Spuren Q-S enthalten den Säureausfluß aus den Reaktionen 5-7. Die Anwesenheit des 500 Basepaare umfassenden  
 35 Fragments in den Spuren Q-S zeigt, daß die 5'-modifizierte, an den Träger gebundene DNA durch Einwirkenlassen



von Bedingungen, von denen bekannt ist, daß die modifizierte  
Tritylgruppe gespalten wird, auf den Träger gewonnen werden  
kann.

5     Äquivalente

Der Fachmann auf dem einschlägigen Fachgebiet erkennt oder  
ist lediglich unter Verwendung von Routineexperimenten in  
der Lage, zahlreiche Äquivalente der speziellen Ausführungs-  
formen der hier beschriebenen Erfindung aufzufinden. Diese  
10     und alle anderen Äquivalente sollen von den folgenden An-  
sprüchen umfaßt sein.

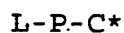
15

90 120 093.1

Millipore Corporation

### Patentansprüche

1. Verbindung der Formel:



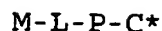
worin bedeuten:

C\* ein natürliches Produkt, Biopolymer oder Synthon für ein Biopolymer oder natürliches Produkt,

P eine an eine funktionelle Gruppe von C\* gebundene Schutzgruppe, die von der geschützten funktionellen Gruppe unter derartigen Bedingungen, daß die funktionelle Gruppe regeneriert wird, entfernt werden kann, und L eine Funktionalität zur Bindung einer modifizierenden Einheit an P, vorausgesetzt, daß L nicht für eine Phenol(hydroxyl)gruppe oder eine Arylaminogruppe steht.

2. Verbindung nach Anspruch 1, wobei C\* aus der Gruppe Nucleoside, Nucleotide, Oligonucleotide, Nucleinsäuren, Aminosäuren, Peptide, Proteine, Monosaccharide, Oligosaccharide, Kohlenhydrate, Lipide, Steroide und Alkaloide ausgewählt ist.
3. Verbindung nach Anspruch 1, wobei P für eine Schutzgruppe steht, die aus der Gruppe Trityl, 4-Monomethoxytrityl, 4,4'-Dimethoxytrityl, 9-Phenylxanthen-9-yl, 9-Fluorenylmethyloxycarbonyl, tert.-Butoxycarbonyl, Benzyl, Benzyloxycarbonyl, Alkoxybenzyl, Benzyloxymethyl, Alkoxymethyl, Alkylsilyl, Arylsilyl, Benzoyl, Phenoxyacetyl und Alkoxyacetyl ausgewählt ist, wobei P gegebenenfalls substituiert sein kann.

4. Verbindung der Formel:



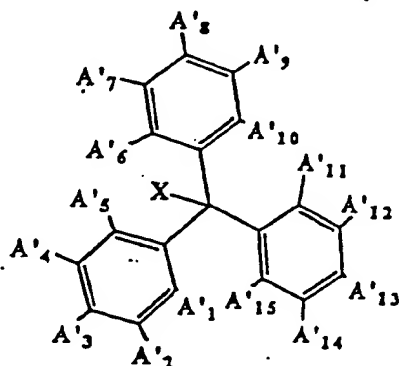
worin bedeuten:

C\* ein natürliches Produkt, Biopolymer oder Synthon für ein Biopolymer oder natürliches Produkt,  
P eine an eine funktionelle Gruppe von C\* gebundene Schutzgruppe, die von der geschützten funktionellen Gruppe unter derartigen Bedingungen, daß die funktionelle Gruppe regeneriert wird, entfernt werden kann,  
M eine modifizierende Einheit, die aus der Gruppe Nachweismarkierungen, biologisch aktive Moleküle und Verbindungen zur Unterstützung einer Reinigung oder Immobilisierung von C\* ausgewählt ist, vorausgesetzt, daß M nicht für 9-Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc), Levulinoyl oder 4,5-Dichlorphthalimido steht, und  
L eine Funktionalität zur Bindung von M an P, vorausgesetzt, daß L nicht für eine Phenol(hydroxyl)gruppe oder eine Arylaminogruppe steht.

5. Verbindung nach Anspruch 4, wobei C\* aus der Gruppe Nucleoside, Nucleotide, Oligonucleotide, Nucleinsäuren, Aminosäuren, Peptide, Proteine, Saccharide, Oligosaccharide, Kohlenhydrate, Lipide, Steroide und Alkaloide ausgewählt ist.
6. Verbindung nach Anspruch 4, wobei M aus der Gruppe Radioisotope, Fluorophore, lumineszierende Verbindungen, chemilumineszierende Verbindungen, Biotine, Peptide, Proteine, Nucleoside, Nucleotide, Oligonucleotide, Nucleinsäuren, Saccharide, Oligosaccharide, Kohlenhydrate und Polymere ausgewählt ist.

7. Verbindung nach Anspruch 4, wobei P für eine Schutzgruppe steht, die aus der Gruppe Trityl, 4-Monomethoxytrityl, 4,4'-Dimethoxytrityl, 9-Phenylxanthen-9-yl, 9-Fluorenylmethyloxycarbonyl, tert.-Butoxycarbonyl, Benzyl, Benzyloxycarbonyl, Benzyloxymethyl, Alkoxycarbonyl, Alkoxymethyl, Alkylsilyl, Arylsilyl, Benzoyl, Phenoxyacetyl und Alkoxyacetyl ausgewählt ist, wobei P gegebenenfalls substituiert sein kann.

8. Verbindung der Formel:

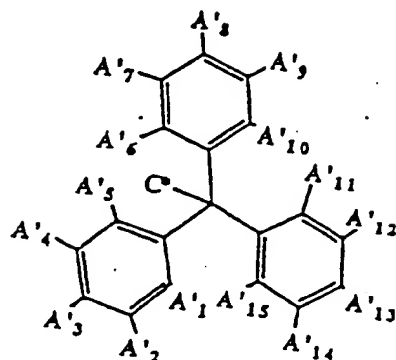


worin A'<sub>1</sub> bis A'<sub>15</sub> gleich oder verschieden sind und aus der Gruppe H, R, OR, Z und L ausgewählt sind, vorausgesetzt, daß mindestens eine Gruppe L vorhanden ist, R für eine Alkylgruppe mit 1 bis 20 Kohlenstoffatom(en), die gegebenenfalls ein Heteroatom enthalten kann, oder ein substituiertes oder nicht substituiertes Aryl steht, Z - (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>C(O)OH, - (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>SO<sub>3</sub>H, - (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NO<sub>2</sub>, - (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CN, - (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>OH, - (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NH<sub>2</sub> und - (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>SH bedeutet, wobei n eine ganze Zahl von 0 bis 20 bedeutet, vorausgesetzt, daß bei n = 0 Z für eine von OH oder -NH<sub>2</sub> verschiedene Gruppe steht, L - (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>C(O)W, - (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>SO<sub>2</sub>W, - (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>W darstellt, wobei n für eine ganze Zahl von 0 bis 20 steht, und X eine aus Cl, Br, I und BF<sub>4</sub> ausgewählte Abgangsgruppe

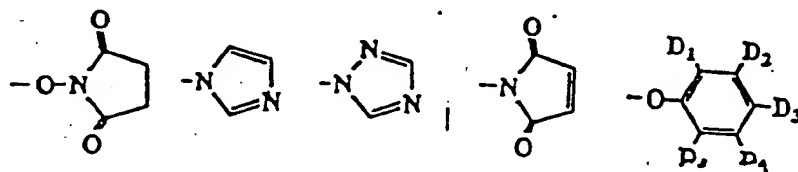
bedeutet und

W aus der Gruppe Cl, Br, I, -NCS, -NCO ausgewählt ist.

9. Verbindung der Formel:



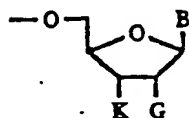
worin A'<sub>1</sub> bis A'<sub>15</sub> gleich oder verschieden sind und aus der Gruppe H, R, OR, Z und L ausgewählt sind, vorausgesetzt, daß mindestens eine Gruppe L vorhanden ist, R eine Alkylgruppe mit 1 bis 20 Kohlenstoffatom(en), die gegebenenfalls ein Heteroatom enthalten kann, oder ein substituiertes oder nicht substituiertes Aryl bedeutet, Z - (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>C(O)OH, - (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>SO<sub>3</sub>H, - (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NO<sub>2</sub>, - (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CN, - (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>OH, - (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NH<sub>2</sub> und - (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>SH darstellt, wobei n für eine ganze Zahl von 0 bis 20 steht, L - (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>C(O)W, - (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>SO<sub>2</sub>W, - (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>W entspricht, wobei n für eine ganze Zahl von 0 bis 20 steht, und W aus der Gruppe Cl, Br, I, -NCS, -NCO,



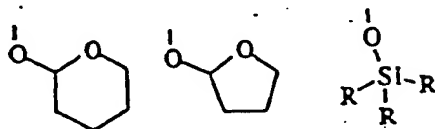
ausgewählt ist und

$D_1$ - $D_5$  gleich oder verschieden sind und aus H, F, Cl, Br, I,  $NO_2$  und CN (ausgewählt sind).

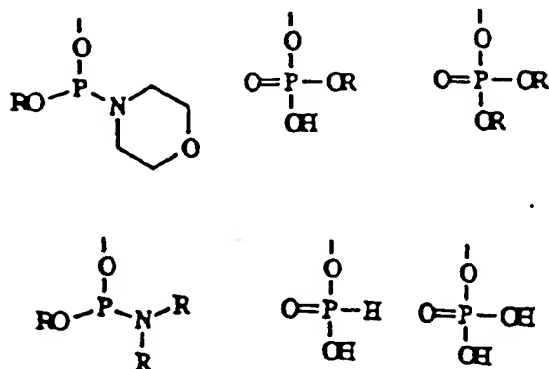
10. Verbindung nach Anspruch 9, wobei C\* ein Nucleosid der Formel:



worin B für eine Nucleosidbase steht, die durch eine eliminierbare Basenschutzgruppe geschützt sein kann, G H, OH, OR,



bedeutet,  
K H, OH,



entspricht und

R für eine Alkylgruppe mit 1 bis 20 Kohlenstoffatom(en), die gegebenenfalls ein Heteroatom enthalten kann, oder ein substituiertes oder nicht substituiertes Aryl steht, bedeutet.

11. Verfahren zur reversiblen Modifizierung eines natürlichen Produkts, Biopolymers oder Synthons für ein natürliches Produkt oder Biopolymer, umfassend die folgenden Schritte:

- a) Kuppeln eines natürlichen Produkts, Biopolymers oder Synthons an eine Schutzgruppe der Formel:

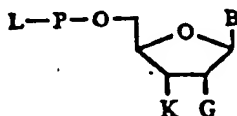


worin P für eine Schutzgruppe zum Schutz einer funktionellen Gruppe des natürlichen Produkts, Biopolymers oder Synthons für ein natürliches Produkt oder Biopolymer steht, die von der geschützten funktionellen Gruppe unter derartigen Bedingungen, daß die funktionelle Gruppe regeneriert wird, entfernt werden kann, L eine Funktionalität zur Bindung einer modifizierenden Einheit an P bedeutet, und

- b) Kuppeln einer modifizierenden Einheit an L.

12. Verfahren zur reversiblen Modifizierung eines Polynucleotids, umfassend die folgenden Schritte:

- a) Kuppeln eines modifizierten geschützten Nucleosid-beta-cyanoethylphosphoramidits an eine 5'-terminale Hydroxylgruppe des Polynucleotids, wobei das Nucleosidphosphoramidit der folgenden Struktur entspricht:

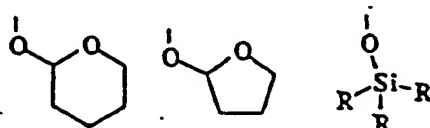


worin P für eine Nucleosidschutzgruppe zum Schutz der 5'-Hydroxylgruppe steht, die unter derartigen Bedingungen, daß die 5'-Hydroxylgruppe regeneriert wird, entfernt werden kann,

L eine Funktionalität zur Bindung einer modifizierenden Gruppe bedeutet,

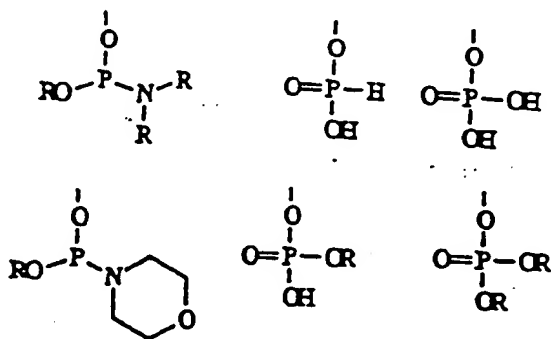
B eine Nucleosidbase darstellt, die durch eine eliminierbare Schutzgruppe geschützt werden kann,

G H, OH, OR,



bedeutet,

K H, OH,



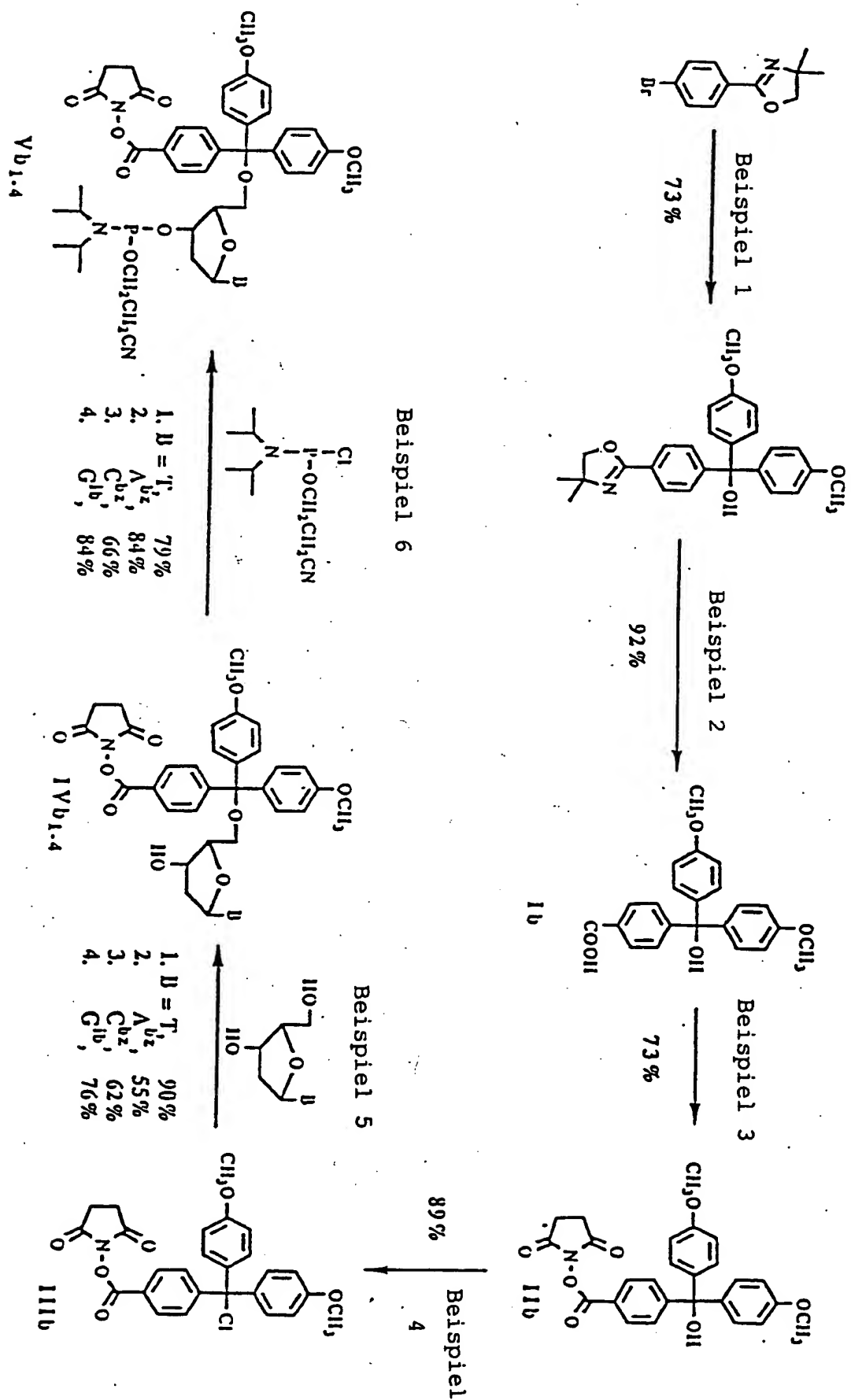
entspricht und

R für eine Alkylgruppe mit 1 bis 20 Kohlenstoffatom(en), die gegebenenfalls ein Heteroatom enthalten kann, oder ein substituiertes oder nicht substituiertes Aryl steht, und

b) Kuppeln einer modifizierenden Einheit an L.

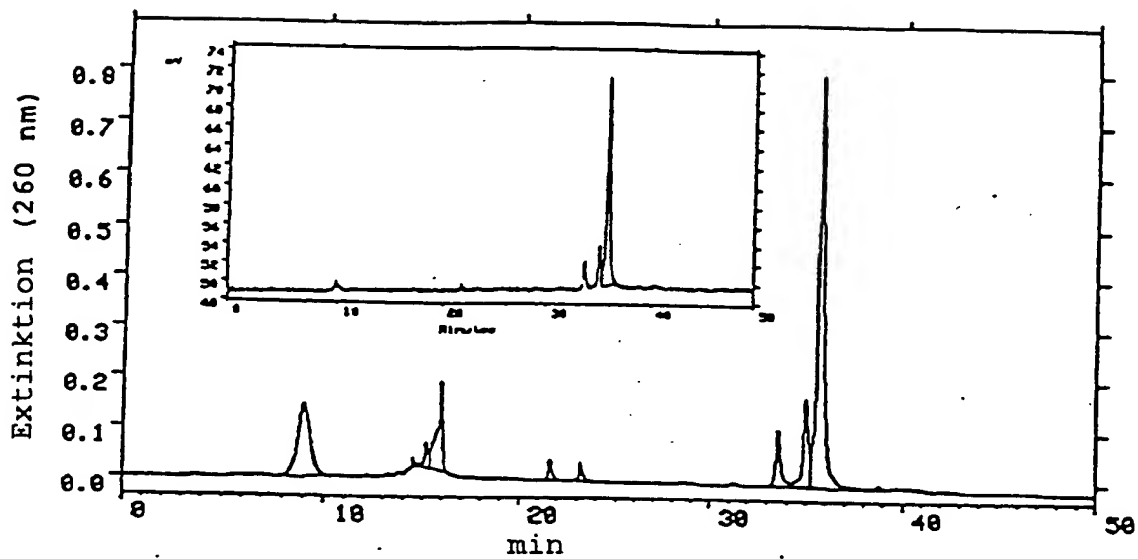


Figure 1

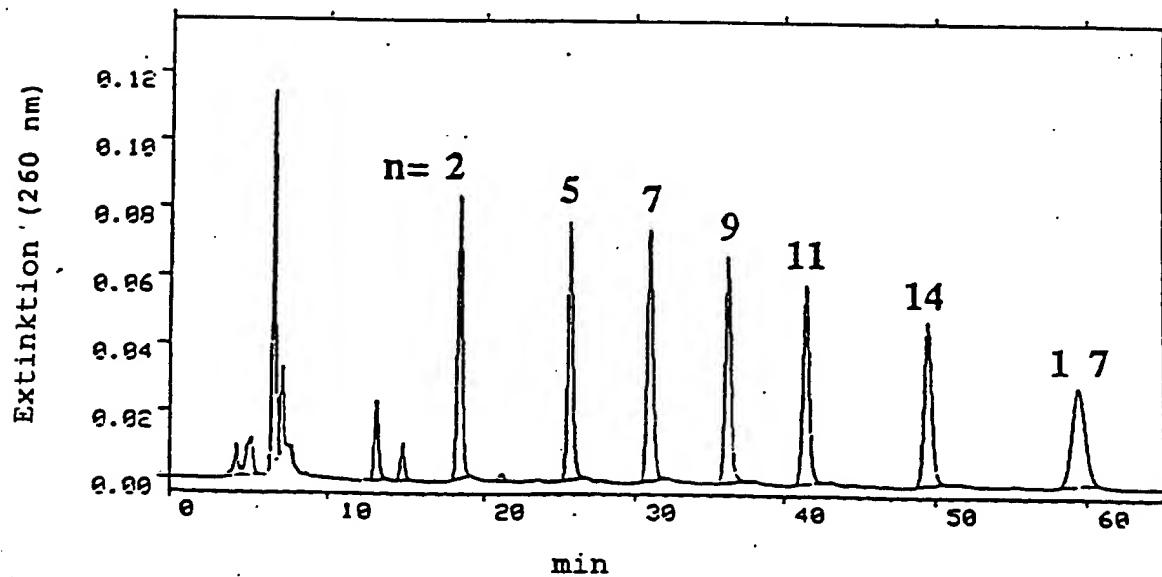


2/3

Figur 2



Figur 3



3/3

Figur 4

